
Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição

Este documento focaliza métodos de referência para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das bactérias aeróbicas por macrodiluição em caldo, microdiluição em caldo e diluição em ágar.

Uma norma de aplicação global desenvolvida mediante o processo consensual do NCCLS.





Permission to translate the M2-A8 has been granted to ANVISA by CLSI (Formerly NCCLS). In the event of any variations in meaning that may be introduced through translation, the original NCCLS publication (in English) is authoritative. For each standard, the interpretive data are valid only if the methodology in the standard is followed. NCCLS frequently updates the interpretive tables through new editions and supplements. Users should refer to the most recent edition.

In January 2005, NCCLS changed its name to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Copies of the complete current standards and informational supplement (in English) may be obtained from CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, U.S.A.; telephone: +610.688.0100; fax: +610.688.-700; Internet: www.clsi.org.

The permission granted by NCCLS/CLSI is limited to distribution of M2-A8 by ANVISA to clinical laboratories in Brazil. Permission to reproduce additional copies or otherwise use the text of these documents to an extent not permitted under Copyright Law must be obtained in writing from the Clinical and Laboratory Standards Institute.

Coordenação da Tradução

Silvia Figueiredo Costa

Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Organização Pan Americana de Saúde

Revisor:

Emerson Cavassin. Mestre em Farmácia pela Faculdade de Farmácia da USP. E especialização em Análises Clínicas pela UEL. Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

Direitos de Tradução e Reprodução

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Gerencia Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde

NCCLS...

Servindo A Comunidade Mundial das Ciências Médicas Através de Consenso Voluntário

O NCCLS é uma organização internacional interdisciplinar, sem fins lucrativos, educacional e de desenvolvimento de normas/padrões, que promove o desenvolvimento e uso de normas/padrões e diretrizes consensuais voluntárias na comunidade de atenção à saúde. É reconhecido no mundo inteiro pela aplicação de seu singular processo consensual ao desenvolvimento de normas/padrões e diretrizes para testes de patologia clínica e questões relacionadas com a atenção à saúde. O NCCLS baseia-se no princípio de que o consenso é uma maneira efetiva e custo-eficaz de melhorar os testes clínicos e serviços de atenção à saúde.

Além de desenvolver e promover o uso voluntário de normas/padrões e diretrizes consensuais, o NCCLS fornece um foro aberto e isento para tratar questões que afetam a qualidade dos testes de patologia clínica e a atenção à saúde.

PUBLICAÇÕES

Os documentos do NCCLS são publicados como normas/padrões, diretrizes ou relatórios de comitê.

Norma – Documento desenvolvido através do processo de consenso, o qual identifica claramente os requisitos específicos e essenciais dos materiais, dos métodos, ou das práticas a serem usados sem modificações. Uma norma também pode conter elementos discricionários, que são claramente identificados.

Diretriz – Documento desenvolvido através do processo de consenso, o qual descreve os critérios para as práticas e os procedimentos, ou os materiais operacionais gerais a serem usados de maneira voluntária. Uma diretriz pode ser usada conforme redigida, ou modificada pelo usuário para conformá-la a suas necessidades específicas.

Relatório – Documento que não passou pela revisão consensual e foi publicado pela Diretoria.

PROCESSO CONSENSUAL

O processo consensual voluntário do NCCLS é um protocolo que estabelece critérios formais para:

autorizar um projeto;

- desenvolver e revisar documentos de maneira transparente;
- revisar documentos em resposta a comentários de usuários;
- aceitar um documento como norma/padrão ou diretriz consensual.

A maioria dos documentos do NCCLS são sujeitos a dois níveis de consenso—“proposto” e “aprovado”. Dependendo da necessidade de avaliação ou coleta de campo, os documentos também podem disponibilizados para revisão em nível consensual intermediário (ex., “tentativo”).

Proposta – Documento consensual do NCCLS que passa por um primeiro estágio de revisão pela comunidade de saúde como proposta de norma/padrão ou diretriz. O documento deve receber uma revisão técnica abrangente e minuciosa, incluindo a revisão geral de seu escopo, enfoque e utilidade, e uma revisão detalhada de seu conteúdo técnico e editorial.

Tentativa - Uma norma/padrão ou diretriz tentativa é disponibilizada para revisão e comentários apenas quando há necessidade evidente de avaliação de campo de um método recomendado ou de coleta de dados específicos relativos a um protocolo recomendado. Deve ser revisada para assegurar sua utilidade.

Aprovada – Norma/padrão ou diretriz que recebeu aprovação consensual da comunidade de atenção à saúde. Deve ser revisada para se avaliar a utilidade do documento final, garantir que se chegue a um consenso (ex., que os comentários relativos a versões anteriores foram satisfatoriamente resolvidos) e identificar qualquer necessidade de documentos consensuais adicionais.

As normas/padrões e diretrizes do NCCLS representam uma opinião consensual sobre as boas práticas e refletem uma concordância substancial das partes interessadas, competentes e afetadas materialmente, obtido por meio dos procedimentos consensuais estabelecidos pelo NCCLS. As exigências das normas/padrões e diretrizes do NCCLS podem ser mais ou menos rigorosas do que os regulamentos pertinentes. Conseqüentemente, o acatamento desse documento consensual voluntário não dispensa o usuário da responsabilidade de obedecer aos regulamentos pertinentes.

COMENTÁRIOS

Os comentários dos usuários são essenciais ao processo consensual. Qualquer pessoa pode apresentar um comentário, e todos os comentários são considerados pelo comitê do NCCLS que preparou o documento, em conformidade com o processo consensual. Todos os comentários, incluindo aqueles que resultaram em mudança no documento quando publicado no próximo nível consensual, bem como aqueles que não resultaram em mudança, são respondidos pelo comitê num apêndice do documento. Incentiva-se os leitores a tecer comentários de qualquer formato e em qualquer oportunidade sobre qualquer documento do NCCLS. Envie seus comentários ao seguinte endereço: NCCLS Executive Offices, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087, Estados Unidos.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Os profissionais de saúde de todas as especialidades são instados a participar voluntariamente nos projetos do NCCLS. Para informações adicionais sobre participação nos comitês, favor contactar os Escritórios Executivos do NCCLS.

Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico; Norma Aprovada—Sexta Edição

Resumo

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo que contribua a um processo infeccioso que justifique terapêutica antimicrobiana, sempre que sua sensibilidade não possa ser predita de maneira confiável a partir do conhecimento da identidade do organismo. Os testes de sensibilidade são indicados, com maior frequência, quando se acredita que o organismo causativo pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos geralmente usados.

Há diversos métodos laboratoriais que podem ser usados para medir a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos. O presente documento descreve técnicas padrão de diluição em caldo (macrodiluição e microdiluição) e diluição em ágar, além de incluir uma série de procedimentos para padronizar a execução dos testes. Além disso, descreve o desempenho, as aplicações e as limitações dos métodos atualmente recomendados pelo NCCLS.

As informações complementares (tabelas M100) apresentadas junto com a presente norma constituem as informações mais atualizadas sobre a seleção das drogas, a interpretação dos resultados e o controle de qualidade usando os testes padrão na Norma M7. Como de praxe, essas tabelas foram atualizadas e substituem as tabelas publicadas em anos anteriores. As mudanças nas tabelas efetuadas após a edição anterior (M100-S12) são destacadas em **negrito**. Além disso, acrescentou-se um glossário de termos, classes e abreviações dos antibióticos (para uso com os testes de sensibilidade *in vitro* aos agentes antimicrobianos). Acredita-se que esse glossário prestará informações adicionais sobre a Norma M7 aos usuários, uma vez que apresenta a terminologia antimicrobiana usada nos documentos sobre os testes de sensibilidade, que pode ser pouco familiar ou parecer confusa aos usuários nos laboratórios. O glossário, como parte das informações tabulares da M100, será sempre atualizado em futuras revisões (anuais) da Norma M100.

NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition*. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

O processo consensual do NCCLS, mecanismo que permite a revisão de um documento, em dois ou mais níveis, pela comunidade de atenção à saúde, é um processo permanente. Os usuários devem aguardar edições revisadas de qualquer documento. Uma vez que as rápidas mudanças nas tecnologias podem afetar os procedimentos, métodos e protocolos nas normas/padrões e diretrizes, os usuários devem substituir as edições ultrapassadas pelas edições atualizadas dos documentos do NCCLS. As edições atualizadas estão relacionadas no *NCCLS Catalog*, distribuído às organizações membros e, mediante solicitação, aos não-membros. Se sua organização não é membro do NCCLS e gostaria de ser, assim como solicitar um exemplar do *NCCLS Catalog*, favor contatar os Escritórios Executivos do NCCLS. Telefone: +1 610.688.0100; Fax: +1 610.688.0700; E-Mail: exoffice@nccls.org; Website: www.nccls.org

M7-A6
ISBN 1-56238-486-4
ISSN 0273-3099

Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico; Norma Aprovada— Sexta Edição

Volume 23 Número 2

Mary Jane Ferraro, Ph.D., M.P.H., Presidente
Matthew A. Wikler, M.D., M.B.A., Vice Presidente
William A. Craig, M.D.
Michael N. Dudley, Pharm.D.
George M. Eliopoulos, M.D.
David W. Hecht, M.D.
Janet Hindler, MCLS, M.T. (ASCP)
L. Barth Reller, M.D.
Albert T. Sheldon, Jr., Ph.D.
Jana M. Swenson, M.M.Sc.
Fred C. Tenover, Ph.D.
Raymond T. Testa, Ph.D.
Melvin P. Weinstein, M.D.



Esta publicação é protegida por direitos autorais. Nenhuma parte pode ser reproduzida, armazenada em sistema de recuperação, transmitida, ou disponibilizada em qualquer formato ou por qualquer meio (eletrônico, mecânico, fotocópia, gravação, ou outros) sem consentimento prévio, por escrito, do NCCLS, exceto nos casos relacionados a seguir.

Pelo presente instrumento, o NCCLS concede autorização para reproduzir partes limitadas desta publicação, para uso em manuais de procedimentos laboratoriais, num único local; para empréstimo entre bibliotecas; ou para uso em programas educacionais, sempre que as várias cópias dessa reprodução sejam distribuídas gratuitamente, não contenham, em qualquer circunstância, mais do que 20% do texto do documento e incluam o seguinte aviso:

Reproduzido mediante autorização; parte da publicação M7-A6—*Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico; Norma Aprovada—Sexta Edição* (ISBN 1-56238-486-4) do NCCLS. Cópias da atual edição podem ser obtidas no seguinte endereço: NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, Estados Unidos.

Autorização para reproduzir ou usar o texto deste documento além das isenções aqui concedidas ou nos termos da Legislação de Direitos Intelectuais pode ser obtida do NCCLS mediante solicitação por escrito. As autorizações podem ser obtidas no seguinte endereço: Executive Director, NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, Estados Unidos.

Copyright ©2003. The National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Citação Sugerida

(NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition*. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.)

<p>Norma Proposta Junho de 1980</p> <p>Norma Tentativa Dezembro de 1982</p> <p>Norma Aprovada Junho de 1986</p> <p>Norma Tentativa—Segunda Edição Novembro de 1988</p> <p>Norma Aprovada—Segunda Edição Abril de 1990</p> <p>Norma Aprovada—Terceira Edição Dezembro de 1993</p> <p>Norma Aprovada—Quarta Edição Janeiro de 1997</p> <p>Norma Aprovada—Quinta Edição Janeiro de 2000</p>	<p>Norma Aprovada—Sexta Edição Janeiro de 2003</p>
--	---

ISBN 1-56238-486-4

ISSN 0273-3099

Membros do Comitê

Comitê da Área de Microbiologia

James H. Jorgensen, Ph.D.
Presidente

University of Texas Health Science Center
San Antonio, Texas

Mary Jane Ferraro, Ph.D., M.P.H.
Vice Presidente

Massachusetts General Hospital
Boston, Massachusetts

Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana

Mary Jane Ferraro, Ph.D., M.P.H.
Presidente

Massachusetts General Hospital
Boston, Massachusetts

Matthew A. Wikler, M.D., M.B.A.
Vice Presidente

ViroPharma, Incorporated
Exton, Pennsylvania

William A. Craig, M.D.

University of Wisconsin
Madison, Wisconsin

Michael N. Dudley, Pharm.D.

Essential Therapeutics, Inc.
Mountain View, California

George M. Eliopoulos, M.D.

Beth Israel Deaconess Medical Center
Boston, Massachusetts

David W. Hecht, M.D.

Loyola University Medical Center
Maywood, Illinois

Janet Hindler, MCLS, M.T. (ASCP)

UCLA Medical Center
Los Angeles, California

L. Barth Reller, M.D.

Duke University Medical Center
Durham, North Carolina

Albert T. Sheldon, Jr., Ph.D.

Food and Drug Administration
Rockville, Maryland

Jana M. Swenson, M.M.Sc.

Centers for Disease Control and Prevention
Atlanta, Georgia

Fred C. Tenover, Ph.D.

Centers for Disease Control and Prevention
Atlanta, Georgia

Raymond T. Testa, Ph.D.

Wyeth-Ayerst Research
Pearl River, New York

Melvin P. Weinstein, M.D.

Robert Wood Johnson Medical School
New Brunswick, New Jersey

Consultores

Steven D. Brown, Ph.D.	Clinical Microbiology Institute Wilsonville, Oregon
Karen Bush, Ph.D.	R. W. Johnson Pharmaceutical Research Institute Raritan, New Jersey
Franklin R. Cockerill, III, M.D.	Mayo Clinic/Mayo Foundation Rochester, Minnesota
Mike E. Cox	Anaerobe Systems Morgan Hill, California
Sharon K. Cullen, B.S., RAC	Dade Behring Inc. MicroScan West Sacramento, California
Dwight J. Hardy, Ph.D.	University of Rochester Medical Center Rochester, New York
Ronald N. Jones, M.D.	The JONES Grupo/JMI North Liberty, Iowa
Donald E. Low, M.D.	Toronto Medical Labs. & Mount Sinai Hospital University of Toronto
John E. McGowan, Jr., M.D.	Emory University, Rollins School of Public Health Atlanta, Georgia
Professor Ian Phillips	EUCAST Malaga, Spain
James A. Poupard, Ph.D.	GlaxoSmithKline Collegeville, Pennsylvania
Robert P. Rennie, Ph.D.	University of Alberta Hospital Edmonton, Alberta
Rosemary Roberts, M.D.	FDA Division of Anti-Infective Drug Products Rockville, Maryland
Daniel F. Sahm, Ph.D.	Focus Technologies Inc. Herndon, Virginia
Sally Selepak, M.T. (ASCP)	FDA Center for Devices/Rad. Health Rockville, Maryland
Daniel L. Shungu, Ph.D.	Merck & Company, Inc. Rahway, New Jersey
John D. Turnidge, M.D.	Women's and Children's Hospital North Adelaide, Australia

Consultores (Continuação)

Linda J. Utrup, Ph.D.

USDA
Riverdale, Maryland

Lois M. Schmidt, D.A.
Oficial de Ligação

NCCLS
Wayne, Pennsylvania

Tracy A. Dooley, M.L.T.(ASCP)
Gerente do Projeto

NCCLS
Wayne, Pennsylvania

Patrice E. Polgar
Editor

NCCLS
Wayne, Pennsylvania

Donna M. Wilhelm
Editor Assistente

NCCLS
Wayne, Pennsylvania

Membros Ativos (em 1º de outubro de 2002)

Membros Mantenedores

Abbott Laboratories
American Association for
Clinical Chemistry
Beckman Coulter, Inc.
BD and Company
bioMérieux, Inc.
CLMA
College of American Pathologists
GlaxoSmithKline
Nippon Becton Dickinson Co., Ltd.
Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.
Pfizer Inc
Roche Diagnostics, Inc.

Membros Profissionais

AISAR-Associazione Italiana per lo
Studio degli
American Academy of Family
Physicians
American Association for
Clinical Chemistry
American Association for
Respiratory Care
American Chemical Society
American Medical Technologists
American Public Health Association
American Society for Clinical
Laboratory Science
American Society of Hematology
American Society for Microbiology
American Type Culture
Collection, Inc.
Asociacion Mexicana de
Bioquímica Clínica A.C.
Assn. of Public Health Laboratories
Assoc. Micro. Clinici Italiani-
A.M.C.L.I.
British Society for Antimicrobial
Chemotherapy
CADIME-Camara De Instituciones
De Diagnostico Medico
Canadian Society for Medical
Laboratory Science—Société
Canadienne de Science de
Laboratoire Médical
Clinical Laboratory Management
Association
COLA
College of American Pathologists
College of Medical Laboratory
Technologists of Ontario

College of Physicians and
Surgeons of Saskatchewan
ESCMID
Fundación Bioquímica Argentina
Internacional Association of Medical
Laboratory Technologists
International Council for
Standardization in Haematology
International Federation of
Clinical Chemistry
Italian Society of Clinical
Biochemistry and Clinical
Molecular Biology
Japan Society of Clinical Chemistry
Japanese Committee for Clinical
Laboratory Standards
Joint Commission on Accreditation
of Healthcare Organizations
National Academy of Clinical
Biochemistry
National Association of Testing
Authorities – Australia
National Society for
Histotechnology, Inc.
Ontario Medical Association
Quality Management Program-
Laboratory Service
RCPA Quality Assurance Programs
PTY Limited
Sociedade Brasileira de Analises
Clinicas
Sociedad Espanola de Bioquímica
Clínica y Patología Molecular
Taiwanese Committee for Clinical
Laboratory Standards (TCCLS)
Turkish Society of Microbiology

Membros Governamentais

Association of Public Health
Laboratories
Armed Forces Institute of Pathology
BC Centre for Disease Control
Centers for Disease Control and
Prevention
Centers for Medicare & Medicaid
Services/CLIA Program
Centers for Medicare & Medicaid
Services
Chinese Committee for Clinical
Laboratory Standards
Commonwealth of Pennsylvania
Bureau of Laboratories
Department of Veterans Affairs

Deutsches Institut für Normung
(DIN)
FDA Center for Devices and
Radiological Health
FDA Center for Veterinary
Medicine
FDA Division of Anti-Infective
Drug Products
Iowa State Hygienic Laboratory
Massachusetts Department of
Public Health Laboratories
National Center of Infectious
and Parasitic Diseases (Bulgaria)
National Health Laboratory Service
(South Africa)
National Institute of Standards
and Technology
New York State Department of
Health
Ohio Department of Health
Ontario Ministry of Health
Pennsylvania Dept. of Health
Saskatchewan Health-Provincial
Laboratory
Scientific Institute of Public Health;
Belgium Ministry of Social
Affairs, Public Health and the
Environment
Swedish Institute for Infectious
Disease Control
Thailand Department of Medical
Sciences

Membros na Indústria

AB Biodisk
Abbott Laboratories
Abbott Laboratories, MediSense
Products
Acrometrix Corporation
Alifax S.P.A.
Ammirati Regulatory Consulting
Anaerobe Systems
Assessor
AstraZeneca
AstraZeneca R & D
Boston
Avant Immunotherapeutics, Inc.
Aventis
Axis-Shield POC AS
Bayer Corporation – Elkhart, IN
Bayer Corporation – Tarrytown, NY
Bayer Corporation – West Haven,
CT
Bayer Medical Ltd.

BD	F. Hoffman-La Roche AG	Replidyne
BD Biosciences – San Jose, CA	Fort Dodge Animal Health	Roche Diagnostics GmbH
BD Consumer Products	General Hospital Vienna (Austria)	Roche Diagnostics, Inc.
BD Diagnostic Systems	Gen-Probe	Roche Laboratories (Div. Hoffmann-La Roche Inc.)
BD Italia S.P.A.	GlaxoSmithKline	Sarstedt, Inc.
BD VACUTAINER Systems	Greiner Bio-One Inc.	SARL Laboratoire Carron (France)
Beckman Coulter, Inc.	Helena Laboratories	Schering Corporation
Beckman Coulter, Inc. Primary Care Diagnostics	Home Diagnostics, Inc.	Schleicher & Schuell, Inc.
Beckman Coulter K.K. (Japan)	IGEN Inc.	Second Opinion
Bio-Development SRL	Immunicon Corporation	Showa Yakuhin Kako Company, Ltd.
Bio-Inova Life Sciences International	Instrumentation Laboratory	Streck Laboratories, Inc.
Bio-Inova Life Sciences North America	International Technidyne Corporation	SurroMed, Inc.
BioMedia Laboratories Sdn Bhd	IntraBiotics Pharmaceuticals, Inc.	Synermed Diagnostic Corp.
BioMérieux (NC)	I-STAT Corporation	Sysmex Corporation (Japan)
bioMérieux, Inc. (MO)	Johnson and Johnson Pharmaceutical Research and Development, L.L.C.	Sysmex Corporation (Long Grove, IL)
Biometry Consultants	Kendall Sherwood-Davis & Geck LAB-Interlink, Inc.	The Clinical Microbiology Institute
Bio-Rad Laboratories, Inc.	Laboratory Specialists, Inc.	The Toledo Hospital (OH)
Bio-Rad Laboratories, Inc. - France	Labtest Diagnostica S.A.	Theravance Inc.
Biotest AG	LifeScan, Inc. (a Johnson & Johnson Company)	Transasia Engineers
Blaine Healthcare Associates, Inc.	Lilly Research Laboratories	Trek Diagnostic Systems, Inc.
Bristol-Myers Squibb Company	Macemon Consultants	Versicor, Inc.
Canadian External Quality Assessment Laboratory	Medical Device Consultants, Inc.	Vetoquinol S.A.
Capital Management Consulting, Inc.	Merck & Company, Inc.	Visible Genetics, Inc.
Carl Schaper	Minigrip/Zip-Pak	Vysis, Inc.
Checkpoint Development Inc.	Molecular Diagnostics, Inc.	Wallac Oy
Chiron Corporation	mvi Sciences (MA)	Wyeth-Ayerst
ChromaVision Medical Systems, Inc.	Nabi	Xyletech Systems, Inc.
Chronolab Ag	Nichols Institute Diagnostics (Div. of Quest Diagnostics, Inc.)	YD Consultant
Clinical Design Grupo Inc.	NimbleGen Systems, Inc.	YD Diagnostics (Seoul, Korea)
Clinical Laboratory Improvement Consultants	Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.	
Cognigen	Nippon Becton Dickinson Co., Ltd.	Associações de Classe
Community Medical Center (NJ)	Norfolk Associates, Inc.	AdvaMed
Control Lab (Brazil)	Novartis Pharmaceuticals Corporation	Association of Medical Diagnostic Manufacturers
Copan Diagnostics Inc.	Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. (Raritan, NJ)	Japan Association Clinical Reagents Ind. (Tokyo, Japan)
Cosmetic Ingredient Review	Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. (Rochester, NY)	Medical Industry Association of Australia
Cubist Pharmaceuticals	Oxoid Inc.	
Dade Behring Inc. - Deerfield, IL	Paratek Pharmaceuticals	Membros Associados Ativos
Dade Behring Inc. - Glasgow, DE	Pfizer Inc	31 st Medical Grupo/SGSL (APO, AE)
Dade Behring Inc. - Marburg, Germany	Pharmacia Corporation	67 th CSH Wuerzburg, GE (NY)
Dade Behring Inc. - Sacramento, CA	Philips Medical Systems	121 st General Hospital (CA)
Dade Behring Inc. - San Jose, CA	Powers Consulting Services	Academisch Ziekenhuis-VUB (Belgium)
David G. Rhoads Associates, Inc.	Premier Inc.	Acadiana Medical Laboratories, LTD (LA)
Diagnostics Consultancy	Procter & Gamble Pharmaceuticals, Inc.	Adena Regional Medical Center (OH)
Diagnostic Products Corporation	The Product Development Grupo	Advocate Healthcare Lutheran General (IL)
Eiken Chemical Company, Ltd.	QSE Consulting	
Elan Pharmaceuticals	Quintiles, Inc.	
Electa Lab s.r.l.	Radiometer America, Inc.	
Enterprise Analysis Corporation	Radiometer Medical A/S	
Essential Therapeutics, Inc.		
EXPERTech Associates, Inc.		

Akershus Central Hospital and AFA (Norway)	Clendo Lab (Puerto Rico)	Hahnemann University Hospital (PA)
Albemarle Hospital (NC)	Clinical Laboratory Partners, LLC (CT)	Harris Methodist Erath County (TX)
Allegheny General Hospital (PA)	CLSI Laboratories (PA)	Harris Methodist Fort Worth (TX)
Allina Health System (MN)	Columbia Regional Hospital (MO)	Hartford Hospital (CT)
Alton Ochsner Medical Foundation (LA)	Commonwealth of Kentucky	Headwaters Health Authority (Alberta, Canada)
Antwerp University Hospital (Belgium)	Community Hospital of Lancaster (PA)	Health Network Lab (PA)
Arkansas Department of Health	CompuNet Clinical Laboratories (OH)	Health Partners Laboratories (VA)
ARUP at University Hospital (UT)	Cook County Hospital (IL)	Heartland Regional Medical Center (MO)
Armed Forces Research Institute of Medical Science (APO, AP)	Cook Children's Medical Center (TX)	Highlands Regional Medical Center (FL)
Associated Regional & University Pathologists (UT)	Covance Central Laboratory Services (IN)	Hoag Memorial Hospital Presbyterian (CA)
Aurora Consolidated Laboratories (WI)	Danish Veterinary Laboratory (Denmark)	Holmes Regional Medical Center (FL)
Azienda Ospedale Di Lecco (Italy)	Danville Regional Medical Center (VA)	Holzer Medical Center (OH)
Bay Medical Center (MI)	Delaware Public Health Laboratory	Hopital du Sacre-Coeur de Montreal (Montreal, Quebec, Canada)
Baystate Medical Center (MA)	Department of Health & Community Services (New Brunswick, Canada)	Hôpital Maisonneuve – Rosemont (Montreal, Canada)
Bbagnas Duzen Laboratories (Turkey)	DesPeres Hospital (MO)	Hospital for Sick Children (Toronto, ON, Canada)
Bermuda Hospitals Board	DeTar Hospital (TX)	Hospital Sousa Martins (Portugal)
Bo Ali Hospital (Iran)	Detroit Health Department (MI)	Hotel Dieu Hospital (Windsor, ON, Canada)
Brooks Air Force Base (TX)	Diagnosticos da América S/A (Brazil)	Houston Medical Center (GA)
Broward General Medical Center (FL)	Dr. Everett Chalmers Hospital (New Brunswick, Canada)	Huddinge University Hospital (Sweden)
Cadham Provincial Laboratory	Doctors Hospital (Bahamas)	Hurley Medical Center (MI)
Calgary Laboratory Services	Duke University Medical Center (NC)	Indiana University
Carilion Consolidated Laboratory (VA)	Dwight David Eisenhower Army Med. Ctr. (GA)	Innova Fairfax Hospital (VA)
Cathay General Hospital (Taiwan)	E.A. Conway Medical Center (LA)	Institute of Medical and Veterinary Science (Australia)
Central Peninsula General Hospital (AK)	Eastern Maine Medical Center	International Health Management Associates, Inc. (IL)
Central Texas Veterans Health Care System	East Side Clinical Laboratory (RI)	Jackson Memorial Hospital (FL)
Centre Hospitalier Regional del la Citadelle (Belgium)	Eastern Health (Vic., Australia)	Jersey Shore Medical Center (NJ)
Centro Diagnostico Italiano (Milano, Italy)	Elyria Memorial Hospital (OH)	John C. Lincoln Hospital (AZ)
Champlain Valley Physicians Hospital (NY)	Emory University Hospital (GA)	John F. Kennedy Medical Center (NJ)
Chang Gung Memorial Hospital (Taiwan)	Esoterix Center for Infectious Disease (TX)	John Peter Smith Hospital (TX)
Changi General Hospital (Singapore)	Fairview-University Medical Center (MN)	Kadlec Medical Center (WA)
The Charlotte Hungerford Hospital (CT)	Federal Medical Center (MN)	Kaiser Permanente Medical Care (CA)
Children's Hospital (LA)	Florida Hospital East Orlando	Kaiser Permanente (MD)
Children's Hospital (NE)	Focus Technologies (CA)	Kantonsspital (Switzerland)
Children's Hospital & Clinics (MN)	Foothills Hospital (Calgary, AB, Canada)	Keller Army Community Hospital (NY)
Children's Hospital Medical Center (Akron, OH)	Fresenius Medical Care/Spectra East (NJ)	Kenora-Rainy River Regional Laboratory Program (Ontario, Canada)
Children's Hospital of Philadelphia (PA)	Fresno Community Hospital and Medical Center	Kern Medical Center (CA)
Children's Medical Center of Dallas (TX)	Frye Regional Medical Center (NC)	Kimball Medical Center (NJ)
Clarian Health–Methodist Hospital	Gambro BCT (CO)	King Faisal Specialist Hospital
	Geisinger Medical Center (PA)	
	Grady Memorial Hospital (GA)	

(IN)	Guthrie Clinic Laboratories (PA)	(Saudi Arabia)
King Khalid National Guard Hospital (Saudi Arabia)	Montreal Children's Hospital (Canada)	Reid Hospital & Health Care Services (IN)
King's Daughter Medical Center (KY)	Montreal General Hospital (Canada)	Research Medical Center (MO)
Klinični Center (Slovenia)	MRL Pharmaceutical Services, Inc. (VA)	Rex Healthcare (NC)
Laboratories at Bonfils (CO)	Nassau County Medical Center (NY)	Rhode Island Department of Health Laboratories
Laboratoire de Santé Publique du Québec (Canada)	National Institutes of Health (MD)	Riyadh Armed Forces Hospital (Saudi Arabia)
Laboratório Fleury S/C Ltda. (Brazil)	Naval Hospital – Corpus Christi (TX)	Royal Columbian Hospital (New Westminster, BC, Canada)
Laboratory Corporation of America (NJ)	Naval Surface Warfare Center (IN)	Sacred Heart Hospital (MD)
Laboratory Corporation of America (MO)	Nebraska Health System	Saint Mary's Regional Medical Center (NV)
LAC and USC Healthcare Network (CA)	New Britain General Hospital (CT)	St. Alexius Medical Center (ND)
Lakeland Regional Medical Center (FL)	New England Fertility Institute (CT)	St. Anthony Hospital (CO)
Lancaster General Hospital (PA)	New Mexico VA Health Care System	St. Anthony's Hospital (FL)
Langley Air Force Base (VA)	New York University Medical Center	St. Barnabas Medical Center (NJ)
LeBonheur Children's Medical Center (TN)	North Carolina State Laboratory of Public Health	St-Eustache Hospital (Quebec, Canada)
L'Hotel-Dieu de Quebec (Canada)	North Shore – Long Island Jewish Health System Laboratories (NY)	St. Francis Medical Ctr. (CA)
Libero Istituto Univ. Campus BioMedico (Italy)	North Shore University Hospital (NY)	St. John Hospital and Medical Center (MI)
Louisiana State University Medical Center	Northwestern Memorial Hospital (IL)	St. John Regional Hospital (St. John, NB, Canada)
Maccabi Medical Care and Health Fund (Israel)	O.L. Vrouwziekenhuis (Belgium)	St. Joseph Hospital (NE)
Malcolm Grow USAF Medical Center (MD)	Ordre professionnel des technologists médicaux du Québec	St. Joseph's Hospital – Marshfield Clinic (WI)
Martin Luther King/Drew Medical Center (CA)	Ospedali Riuniti (Italy)	St. Joseph's Medical Center (NY)
Massachusetts General Hospital (Microbiology Laboratory)	The Ottawa Hospital (Ottawa, ON, Canada)	St. Joseph Mercy Hospital (MI)
MDS Metro Laboratory Services (Burnaby, BC, Canada)	Our Lady of Lourdes Hospital (NJ)	St. Jude Children's Research Hospital (TN)
Medical College of Virginia Hospital	Our Lady of the Resurrection Medical Center (IL)	St. Luke's Regional Medical Center (IA)
Medicare/Medicaid Certification, State of North Carolina	Pathology and Cytology Laboratories, Inc. (KY)	St. Mary of the Plains Hospital (TX)
Memorial Hospital at Gulfport (MS)	Pathology Associates Medical Laboratories (WA)	St. Mary's Hospital & Medical Center (CO)
Memorial Medical Center (IL)	The Permanente Medical Grupo (CA)	St. Vincent Medical Center (CA)
Memorial Medical Center (LA)	Piedmont Hospital (GA)	Ste. Justine Hospital (Montreal, PQ, Canada)
Jefferson Davis Hwy	Pikeville Methodist Hospital (KY)	Salina Regional Health Center (KS)
Memorial Medical Center (LA)	Pocono Hospital (PA)	San Francisco General Hospital (CA)
Napoleon Avenue	Presbyterian Hospital of Dallas (TX)	Santa Clara Valley Medical Center (CA)
Mercy Medical Center (IA)	Providence Health Care	Seoul Nat'l University Hospital (Korea)
Methodist Hospital (TX)	Queen Elizabeth Hospital (Prince Edward Island, Canada)	Shanghai Center for the Clinical Laboratory (China)
Methodist Hospitals of Memphis (TN)	Queensland Health Pathology Services (Australia)	South Bend Medical Foundation (IN)
MetroHealth Medical Center (OH)	Quest Diagnostics Incorporated (CA)	Southwest Texas Methodist Hospital (TX)
Michigan Department of Community Health	Quintiles Laboratories, Ltd. (GA)	South Western Area Pathology Service (Australia)
Mississippi Baptist Medical Center		Southern Maine Medical Center
Monte Tabor – Centro Italo - Brasileiro de Promocao (Brazil)		Specialty Laboratories, Inc. (CA)

Regions Hospital

Stanford Hospital and Clinics (CA)

State of Washington Department of Health
 Stony Brook University Hospital (NY)
 Stormont-Vail Regional Medical Center (KS)
 Sun Health-Boswell Hospital (AZ)
 Swedish Medical Center – Providence Campus (WA)
 Tampa General Hospital (FL)
 Temple University Hospital (PA)
 Tenet Odessa Regional Hospital (TX)
 The Toledo Hospital (OH)
 Touro Infirmary (LA)
 Trident Regional Medical Center (SC)
 Tripler Army Medical Center (HI)
 Truman Medical Center (MO)
 UCSF Medical Center (CA)
 UNC Hospitals (NC)
 University College Hospital (Galway, Ireland)
 University Hospital (Gent) (Belgium)
 University Hospitals of Cleveland (OH)

The University Hospitals (OK)
 University of Alabama-Birmingham Hospital
 University of Alberta Hospitals (Canada)
 University of Colorado Health Science Center
 University of Chicago Hospitals (IL)
 University of Illinois Medical Center
 University of the Ryukyus (Japan)
 University of Texas M.D. Anderson Cancer Center
 University of Virginia Medical Center
 University of Washington
 UZ-KUL Medical Center (Belgium)
 VA (Denver) Medical Center (CO)
 Virginia Department of Health
 VA (Hines) Medical Center
 VA (Kansas City) Medical Center (MO)
 VA (Western NY) Healthcare System
 VA (San Diego) Medical Center (CA)
 VA (Tuskegee) Medical Center (AL)

VA Outpatient Clinic (OH)
 Vejle Hospital (Denmark)
 Washington Adventist Hospital (MD)
 Washoe Medical Center Laboratory (NV)
 West Jefferson Medical Center (LA)
 West Shore Medical Center (MI)
 Wilford Hall Medical Center (TX)
 William Beaumont Army Medical Center (TX)
 William Beaumont Hospital (MI)
 William Osler Health Centre (Brampton, ON, Canada)
 Williamsburg Community Hospital (VA)
 Winn Army Community Hospital (GA)
 Winnipeg Regional Health Authority (Winnipeg, Canada)
 Wishard Memorial Hospital (IN)
 Yonsei University College of Medicine (Korea)
 York Hospital (PA)

AUTORIDADES

Donna M. Meyer, Ph.D.,
 Presidente
 CHRISTUS Health

Thomas L. Hearn, Ph.D.,
 Presidente Eleito
 Centers for Disease Control and Prevention

MEMBROS DA DIRETORIA

Susan Blonshine, RRT, RPFT,
 FAARC
 TechEd

Wayne Brinster
 BD

Kurt H. Davis, FCSMLS, CAE
 Canadian Society for Medical

Tadashi Kawai, M.D., Ph.D.
 International Clinical Pathology
 Center

J. Stephen Kroger, M.D., MACP
 COLA

Willie E. May, Ph.D.
 National Institute of Standards and

Emil Voelkert, Ph.D.,
Secretário
Roche Diagnostics GmbH

Gerald A. Hoeltge, M.D.,
Tesoureiro
The Cleveland Clinic Foundation

F. Alan Andersen, Ph.D.,
Presidente Imediatamente Anterior
Cosmetic Ingredient Review

John V. Bergen, Ph.D.,
Diretor Executivo

Laboratory Science

Lillian J. Gill, M.S.
FDA Center for Devices and
Radiological Health

Robert L. Habig, Ph.D.
Habig Consulting Grupo

Carolyn D. Jones, J.D., M.P.H.
AdvaMed

Technology

Gary L. Myers, Ph.D.
Centers for Disease Control and
Prevention

Barbara G. Painter, Ph.D.
Pharma Micro Consultancy, LLC

Judith A. Yost, M.A., M.T.(ASCP)
Centers for Medicare & Medicaid
Services

Sumário

Resumo	i
Membros do Comitê	v
Membros Ativos	viii
Prefácio	xvi
Resumo das Principais Mudanças neste Documento	xvii
Declaração da Missão do Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do NCCLS	xix
Precauções Padrão	xix
Enfoque de Sistema de Qualidade	xxi
1 Introdução	1
1.1 Abrangência	1
1.2 Definições	2
2 Indicações para a Execução de Testes de Sensibilidade.....	2
3 Agentes Antimicrobianos	
3.1 Fonte	3
3.2 Pesagem de Pós Antimicrobianos	3
3.3 Preparação de Soluções Padrão	5
3.4 Número de Concentrações Testadas	5
4 Seleção dos Agentes Antimicrobianos para Testes e Relatório de Rotina	5
4.1 Relatórios de Rotina	6
4.2 Nomes Genéricos	6
4.3 Diretrizes de Seleção	8
4.4 Sugestão de Diretrizes para Testes e Relatório Rotineiros e Seletivos	8
5 Preparação do Inóculo para Testes de Diluição	9
5.1 Solução Padrão de Turbidez para a Preparação do Inóculo	9
5.2 Método de Crescimento	10
5.3 Método de Suspensão Direta de Colônias	10
6 Teste de Diluição em Ágar	10
6.1 Reagentes e Materiais	11
6.2 Preparação das Placas de Diluição em Ágar	12
6.3 Preparação do Inóculo	13
6.4 Inoculação das Placas de Diluição em Ágar	13
6.5 Incubação das Placas de Diluição em Ágar	14
6.6 Determinação dos Pontos Finais dos Testes de Diluição em Ágar	14
7 Testes de Diluição em Caldo (Macrodiluição e Microdiluição).....	14
7.1 Meio Caldo Mueller-Hinton	14
7.2 Preparação e Armazenamento de Agentes Antimicrobianos Diluídos.....	16
7.3 Testes de Diluição em Caldo	17

Sumário (Continuação)

8	Organismos Fastidiosos.....	18
8.1	Espécies de <i>Haemophilus</i>	18
8.2	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	19
8.3	<i>Streptococcus pneumoniae</i> e Outros <i>Streptococcus</i> spp.	20
9	Organismos Problema	21
9.1	Estafilococos	22
9.2	Enterococos	22
9.3	Bacilos Gram-Negativos de Espectro Ampliado Produtores de β -Lactamase	23
10	Testes de β -Lactamase	24
10.1	Propósito	24
10.2	Seleção do Testes de β -Lactamase	24
11	Relatórios dos Resultados de CIM	24
11.1	Sensível	25
11.2	Intermediária	25
11.3	Resistente	25
12	Testes de Controle de Qualidade	25
12.1	Propósito	25
12.2	Responsabilidades de Controle de Qualidade	25
12.3	Cepas de Referência para Controle de Qualidade	26
12.4	Armazenamento das Cepas de Controle de Qualidade	28
12.5	Controle de Qualidade de Lotes	28
12.6	Limites de Controle de Qualidade da CIM	29
12.7	Frequência dos Testes de Controle de Qualidade	29
12.8	Frequência dos Testes de Controle de Qualidade dos Testes de Triagem	30
12.9	Ação Corretiva	30
12.10	Relatório de Resultados de Testes Clínicos para Testes Fora-do-Controle.....	32
12.11	Verificação dos Resultados dos Testes Clínicos	32
12.12	Outros Testes de Controle	32
13	Limitações da Metodologia dos Testes de Diluição	33
13.1	Aplicação dos Diversos Grupos de Organismos	33
13.2	Resultados Enganadores	33
13.3	Emergência de Resistência	33
14	Testes de Triagem	34
	Referências Bibliográficas	35
	Apêndice A. Fluxogramas do Protocolo de Controle de Qualidade	37
	Resumo dos Comentários e das Respostas do Subcomitê	39
	Publicações Afins do NCCLS	49

Volume 23 e M7-A6

Prefácio

Nesta revisão de 2003 da Norma M7—*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* do NCCLS, várias seções foram acrescentadas ou revisadas. Em especial, acrescentou-se uma nova seção sobre a verificação de resultados incomuns de testes clínicos, a qual está relacionada com uma nova Tabela 8 na M100. A seção sobre Controle de Qualidade detalha, agora, os critérios para uma opção de testes durante 20 ou 30 dias para converter o esquema de testes de diários para semanais. A seção 8 sobre testes de organismos fastidiosos foi expandida. A versão mais recente das tabelas M100 (M100-S13), que são publicadas em separado nos anos entre revisões do texto, foi incluída neste documento para assegurar que os usuários estarão cientes das diretrizes mais recentes do Subcomitê em relação aos métodos e às informações tabulares que normalmente são apresentadas nas tabelas anuais. A Norma M100-S14 será atualizada durante as reuniões do subcomitê ao longo de 2003 e publicada novamente, como documento separado, em janeiro de 2004.

Esta edição da M7 contém muitas outras mudanças editoriais e processuais resultado das reuniões do Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana desde 2000, e várias mudanças nas tabelas M100 ocorridas no último ano. As mudanças específicas nas tabelas M100 encontram-se resumidas no início das folhas volantes relativas à M100-S13 com este documento. As mudanças mais importantes na Norma M7 encontram-se resumidas a seguir.

Foi uma honra presidir o Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana durante os últimos seis anos. Muitos membros do Subcomitê (que agora totaliza mais de 180 voluntários, incluindo membros, assessores e observadores) foram indispensáveis para a elaboração desse documento. Além disso, gostaria de agradecer aos presidentes dos grupos de trabalho do Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana por suas valiosas contribuições durante os três últimos anos. Dentre eles, gostaria de mencionar Karen Bush (Grupo de Trabalho para ESBL); Frank Cockerill (Grupo de Trabalho para Agentes de Bioterrorismo); Sharon Cullen (Grupo de Trabalho para Controle de Qualidade); Dwight Hardy (Grupo de Trabalho para *Stenotrophomonas* e *Burkholderia*); Janet Hindler (Grupo de Trabalho para a M39—Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data); David Hecht (Metodologia dos Testes de Sensibilidade Antimicrobiana para Bactérias Anaeróbicas); Jana Swenson (Grupo de Trabalho de Revisão de Textos); Fred Tenover (Grupos de Trabalho para Organismos Exigentes e Estafilococos); e Matt Wikler (Grupo de Trabalho para Enterobactérias e M23—Development of *In Vitro* Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters Desenvolvimento de Critérios e Parâmetros de Controle de Qualidade para Testes de Sensibilidade *In Vitro*).

Mary Jane Ferraro, Ph.D., M.P.H.

Presidente, Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana.

Resumo das Principais Mudanças neste Documento

Acréscimos ao documento

Localização	Informação Acrescentada
Seção 3.2	Informação sobre a determinação da potência da droga e exemplos de equações
Seção 4.2.1.3	Texto relativo às classes de agentes antimicrobianos e subclasses de cefens
Seção 4.2.5	Texto relativo à sensibilidade a tetraciclina
Seção 6.1.1 (5)	Texto relativo ao pH final do ágar Mueller-Hinton
Seção 7.1 (4)	Informações sobre como suplementar o caldo Mueller-Hinton com sangue lisado de cavalo
Seção 9.1.1	Relatório sobre oxacilina para isolados de estafilococos portadores do gene <i>mecA</i>
Seção 9.1.1, 4º marcador	Texto relativo a relatórios sobre resistência a MRS
Seção 9.1.3	Texto relativo a cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a vancomicina
Seção 9.2.1	Texto relativo a um teste positivo de β -lactamase
Seção 12.2	Responsabilidades de CQ adicionais dos fabricantes
Seção 12.3	Explicação sobre as cepas de <i>H. influenzae</i> ATCC 49247 e 49766
Seção 12.4	Manutenção dos organismos para as cepas de CQ <i>E. coli</i> ATCC 35218 e <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603
Seção 12.4, 3º marcador	Texto relativo a subculturas de cepas de CQ
Seção 12.5 (5)	Recomendação sobre o uso de <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211
Seção 12.7.2.1	Texto sobre a opção de 20 dias de testes de CQ visando testes semanais
Seção 12.7.2.2	Texto esclarecendo a frequência dos testes de CQ
Seção 12.8	Nova seção sobre a frequência dos testes de CQ para triagem
Seção 12.9.2.2	Texto sobre a opção de 20 dias de testes de CQ visando ação corretiva adicional
Seção 12.11	Nova seção sobre a verificação dos resultados dos testes clínicos
Seção 13.3	Recomendação relativa à repetição de testes associada com a emergência de resistência

Mudanças no documento

Localização	Mudanças na Informação
Seção 9.1.1, 5º marcador	Recomendação sobre conscientização em relação aos estafilococos resistentes a metilina
Seção 9.1.2	Método de inoculação em ágar para as placas de triagem de oxacilina
Seção 11	Mudança na redação das categorias interpretativas recomendadas

Exclusões do documento

Localização	Informação Excluída
Seção 13.4	Medida de garantia de qualidade

É importante que os usuários das normas M2-A8 e M7-A6 reconheçam que os dispositivos comerciais para testar a sensibilidade não são discutidos nessas normas/padrões. Os métodos descritos no presente documento são procedimentos de referência genéricos, que podem ser usados para testes de sensibilidade de rotina nos laboratórios de patologia clínica para avaliar os dispositivos comerciais quando se contempla o uso rotineiro dos mesmos. Os resultados gerados com os métodos de referência do NCCLS são utilizados pela United States Food and Drug Administration-FDA para avaliar o desempenho dos sistemas comerciais antes de serem liberados para venda nos Estados Unidos. A liberação pela FDA indica que a agência concluiu que aquele dispositivo comercial fornece resultados de sensibilidade substancialmente equivalentes aos gerados usando os métodos de referência do NCCLS para os organismos e agentes antimicrobianos descritos na bula do fabricante, que acompanha o produto. Alguns laboratórios poderão achar que uma diluição comercial, gradiente de antibiótico, colorimétrico, turbidimétrico, fluorométrico, ou outro método apropriado é factível para uso seletivo ou rotineiro.

Missão do Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do NCCLS Volume 23 e M7-A6

O Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do NCCLS é constituído por representantes das profissões, do governo e da indústria, incluindo laboratórios de microbiologia, agências governamentais, provedores de atenção à saúde e educadores, e a indústria farmacêutica e de microbiologia de diagnóstico. Usando o processo de consenso do NCCLS, o subcomitê desenvolve normas/padrões que promovem testes de sensibilidade antimicrobiana acurados e relatórios apropriados.

A missão do Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do NCCLS é:

- desenvolver métodos de referência padrão para os testes de sensibilidade antimicrobiana;
- fornecer parâmetros de controle de qualidade para os testes padrão;
- estabelecer critérios interpretativos para os resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana realizados usando testes padrão;
- sugerir estratégias para os testes e relatório que sejam clinicamente relevantes e custo-eficazes;
- refinar, em base permanente, as normas/padrões e otimizar a detecção de mecanismos de resistência emergente mediante o desenvolvimento de métodos novos ou revisados, critérios de interpretação e parâmetros de controle de qualidade;
- educar os usuários, através da comunicação multimídia, acerca das normas/padrões e diretrizes;
- e promover o diálogo com os usuários desses métodos e aqueles que os aplicam.

O propósito último da missão do subcomitê é fornecer informações úteis que permitam que os laboratórios ajudem o clínico na seleção da terapia antimicrobiana apropriada para a conduta clínica. As normas/padrões e diretrizes devem ser abrangentes e incluir todos os agentes antimicrobianos cujos dados atendem às diretrizes estabelecidas pelo NCCLS. Os valores que norteiam essa missão são qualidade, precisão, equidade, oportunidade, trabalho de equipe, consenso e confiança.

Precauções Padrão

Sendo impossível, com freqüência, saber o que é infeccioso, todos os espécimes de sangue humano devem ser tratados como infecciosos e manuseados de acordo com “precauções padrão”. Essas são novas diretrizes que combinam as características principais das práticas de “isolamento de substâncias corpóreas e precauções padrão.” As precauções padrão cobrem a transmissão de qualquer patógeno e, por isso, são mais abrangentes do que as precauções universais, que visam apenas aos patógenos transmitidos pelo sangue. As diretrizes relativas às precauções padrão e precauções universais são disponibilizadas pelo U.S. Centers for Disease Control and Prevention (*Guideline for Isolation Precautions in Hospitals*. Infection Control and Hospital Epidemiology. CDC. 1996; Vol 17; 1:53-80), (MMWR 1987; 36[suppl 2S] 2S-18S) e (MMWR 1988; 37:377-382, 387-388). No caso de precauções específicas para a prevenção da transmissão laboratorial de infecções transmitidas pelo sangue por instrumentos e materiais de laboratório, assim como as recomendações relativas à conduta de exposições a sangue, favor reportar-se à edição mais recente do documento M29—*Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections* do NCCLS.

Palavras Chave

Número 2

NCCLS

Volume 23

M7-A6

Diluição em ágar, sensibilidade antimicrobiana, diluição em caldo, macrodiluição, microdiluição, concentração inibitória mínima (CIM).

Enfoque de Sistema de Qualidade

O NCCLS endossa o enfoque de sistema de qualidade para o desenvolvimento de normas/padrões e diretrizes, visto que facilita a gestão de projetos; define a estrutura dos documentos por meio de um gabarito; e fornece um processo para identificar os documentos necessários usando a análise de lacunas (*gap analysis*). O enfoque baseia-se no modelo apresentado na edição mais recente do documento HS1— *A Quality System Model for Health Care* do NCCLS. O enfoque de sistema de qualidade aplica-se a um conjunto central de elementos “essenciais dos sistemas de qualidade (EEQs),” básicos a qualquer organização, a todas as operações em qualquer rota de fluxograma, de qualquer organização prestadora de serviços de atenção à saúde. Os EEQs fornecem um arcabouço para a provisão de qualquer tipo de produto ou serviço, servindo como guia dos gerentes. Os elementos essenciais dos sistemas de qualidade (EEQs) são os seguintes.

Elementos Essenciais dos Sistemas de Qualidade--EEQs

Documentos e Registros	Gestão da Informação
Organização	Gestão de Ocorrências
Pessoal	Avaliação
Equipamento	Melhoria de Processos
Compras e Inventário	Serviços e Satisfação
Controle de Processos	Instalações e Segurança

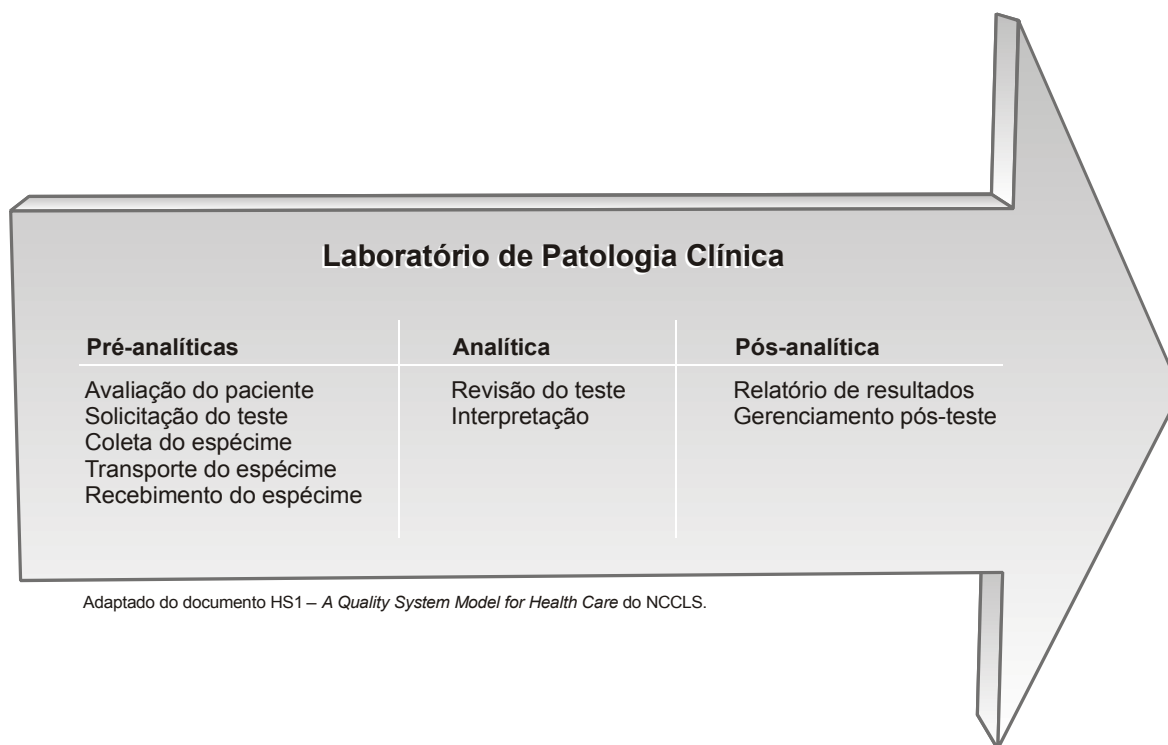
A Norma M7-A6 trata dos seguintes elementos essencial(i)s dos sistemas de qualidade (EEQs):

Documentos e Registros	Organização	Pessoal	Equipamento	Compras e Inventário	Controle de Processos	Gestão da Informação	Gestão de Ocorrências	Avaliação	Aprimoramento de Processos	Serviços e Satisfação	Instalações e Segurança
					X						

Tabela adaptada do documento HS1— *A Quality System Model for Health Care* do NCCLS.

Etapa do Fluxograma

Uma etapa do fluxograma é a descrição dos passos necessários para prover um determinado produto ou serviço fornecido pela organização ou entidade. Por exemplo, a Norma GP26-A2 define uma etapa do fluxograma dos laboratórios clínicos que consiste em três passos seqüenciais: pré-analítico, analítico e pós-analítico. Todos os laboratórios clínicos seguem esses três processos para prestar serviços laboratoriais, a saber, informações laboratoriais de qualidade. A seta mostra a seqüência, da esquerda para a direita, que todo laboratório clínico segue. Além disso, os passos ou subprocessos necessários encontram-se relacionados logo abaixo do fluxograma.



(na fase analítica: “Interpretação laboratorial”. E na pós: “Gerenciamento do espécime após teste”)

A maioria dos documentos do NCCLS está relacionada com os laboratórios de patologia clínica, de maneira que a etapa mais comum do fluxograma pode ser representada conforme visto anteriormente. As rotas do fluxograma relativas a outras atividades de atenção à saúde, ex., serviços respiratórios, serviços de imagens, etc., ou a outros tipos de organizações, (ex), fabricantes de dispositivos médicos, irão diferir das dos laboratórios de patologia clínica serão diferentes das dos laboratórios de patologia clínica. Toda rota de fluxograma descreve a seqüência das atividades necessárias à produção dos produtos ou serviços de uma organização ou entidade específica. Para aqueles documentos relacionados com outras rotas de fluxograma, o ícone refletirá passos diferentes do processo.

M7-A6 focaliza os Seguintes Passos na Etapa do Fluxograma dos Laboratórios de Patologia Clínica

Pré-analíticos					Analíticos		Pós-analíticos	
Avaliação do Paciente	Solicitação do Teste	Coleta do Espécime	Transporte do Espécime	Recebimento do Espécime	Revisão do Teste	Interpretação Laboratorial	Relatório de Resultados	Gestão do Espécime Pós-teste
					X	X	X	

Adaptado do documento HS1— *A Quality System Model for Health Care* do NCCLS.

Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbico; Norma Aprovada—Sexta Edição

1 Introdução

Os métodos de diluição em caldo ou ágar são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano. Para realizar o teste, preparam-se vários tubos de ensaio ou placas com meio caldo ou ágar, aos quais são acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. A seguir, os tubos ou as placas são inoculados com uma suspensão padrão do organismo a ser testado. Após incubação de um dia para outro, a 35° C, examinam-se os testes e determina-se a concentração inibitória mínima (CIM). O resultado final é influenciado, de maneira significativa, pela metodologia, que deve ser cuidadosamente controlada para se obter resultados reprodutíveis (intra e interlaboratório).

O presente documento descreve a metodologia padrão de referência dos testes de diluição em caldo (macrodiluição and microdiluição) e diluição em ágar. A metodologia básica desses testes deriva-se, em grande parte, das informações obtidas no Estudo Colaborativo Internacional.¹ Embora sejam testes padrões de referência, alguns são suficientemente práticos para merecer uso rotineiro, tanto nos laboratórios clínicos, como nos laboratórios de pesquisa.

Encontram-se disponíveis no mercado sistemas comerciais baseados principalmente, ou em parte, em alguns desses métodos, sendo que tais sistemas comerciais podem fornecer resultados essencialmente equivalentes aos testes dos testes do NCCLS descritos neste documento. O United States Food and Drug Administration (U.S. FDA) é responsável pela aprovação e liberação de dispositivos comerciais para uso nos Estados Unidos. O NCCLS não aprova ou endossa produtos ou dispositivos comerciais.

Os testes descritos neste documento focalizam bactérias aeróbicas ou facultativas comumente isoladas que crescem satisfatoriamente após incubação de um dia para outro em meio Mueller-Hinton sem suplementação. Meios e métodos alternativos para alguns organismos fastidiosos encontram-se descritos na Seção 8 e nas Tabelas 2E a 2J e na Tabela 7.

A norma M11—*Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria* do NCCLS descreve testes para bactérias anaeróbicas.

1.1 Escopo

Há uma diversidade de métodos de laboratório que podem ser usados para medir a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos. A presente Norma descreve as técnicas padrão de diluição (macrodiluição and microdiluição) em caldo e em ágar a serem utilizadas para determinar a sensibilidade *in vitro* das bactérias de crescimento aeróbico. A Norma também discute a preparação dos testes de diluição em caldo e em ágar, as condições dos testes (incluindo a preparação e o tamanho do inóculo e o tempo e a temperatura de incubação), os relatórios dos resultados dos testes de CIM, os procedimentos de controle de qualidade e as limitações da metodologia dos testes de diluição. Para auxiliar os laboratórios clínicos, são fornecidas diretrizes para a seleção de agentes antimicrobianos para testes e relatórios de rotina. As normas M2, *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests* e M11, *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria* do NCCLS fornecem as normas para os testes de sensibilidade *in vitro* de bactérias de crescimento aeróbico e anaeróbico, respectivamente.

1.2 Definições ^a

Categoria de Interpretação do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana, *n* - 1) Uma classificação baseada numa resposta *in vitro* de um organismo a um agente antimicrobiano em níveis desse agente que correspondem aos níveis sanguíneos ou tissulares atingíveis com as doses do agente normalmente prescritas; **2) Categoria de Interpretação ‘Sensível’ do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana, *n*** – Categoria que implica que uma infecção devida a um isolado pode ser tratada apropriadamente com a dosagem de um agente antimicrobiano recomendado para esse tipo de infecção e espécie infecciosa, salvo quando de outra maneira indicado; **3) Categoria de Interpretação ‘Intermediária’ do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana, *n*** – Categoria que implica que uma infecção devida a um isolado pode ser tratada apropriadamente em sítios corpóreos em que as drogas se encontram fisiologicamente concentradas ou quando uma dosagem mais alta da droga for possível; também indica uma “zona tampão” (*buffer zone*) que deveria impedir que fatores técnicos menores e fora de controle causem grandes discrepâncias na interpretação; **4) Categoria de Interpretação ‘Resistente’ do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana, *n*** – Os isolados resistentes não são inibidos pelas concentrações do agente antimicrobiano obtidas normalmente com os tratamentos usuais (frequência e dosagem) e/ou caem na faixa em que os mecanismos de resistência antimicrobiana específica são mais prováveis (ex., beta-lactamases), sendo que a eficácia clínica não foi confiável em estudos terapêuticos.

Concentração Inibitória Mínima – CIM, *n* – A menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microorganismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo.

Controle de Qualidade, *n* – Técnicas e atividade operacionais usadas para atender aos requisitos de qualidade.

2 Indicações para a Execução de Testes de Sensibilidade

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo que contribua a um processo infeccioso que justifique quimioterapia antimicrobiana, se sua sensibilidade não pode ser predita, de maneira confiável, a partir da identificação do organismo. Os testes de sensibilidade são iniciados, com mais frequência, quando se acredita que o organismo causativo pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos mais frequentemente usados. Os mecanismos de resistência incluem a produção de enzimas que inativam as drogas, a alteração do sítio-alvo das drogas e a alteração da absorção ou do efluxo das drogas. Alguns organismos ainda possuem sensibilidade previsível a agentes antimicrobianos, e a terapia empírica é amplamente reconhecida. Os testes de sensibilidade são raramente necessários quando a infecção se deve a um microorganismo reconhecidamente sensível a uma droga muito eficaz (ex., a sensibilidade continuada de *Streptococcus pyogenes* à penicilina nos Estados Unidos). Com *S. pyogenes* proveniente de pacientes alérgicos à penicilina, pode-se testar a eritromicina ou outros macrolídeos, de maneira a detectar as cepas resistentes a esses agentes. Os testes de sensibilidade também são importantes nos estudos da epidemiologia da resistência e de novos agentes antimicrobianos.

Deve-se selecionar colônias, isoladas em placas de ágar, de cada tipo de organismo que possa desempenhar um papel patogênico e testar sua sensibilidade. Com frequência, o microorganismo é identificado nesse momento. Misturas de diferentes tipos de microorganismos não devem ser testadas na mesma placa do teste de sensibilidade. A prática de realizar testes de sensibilidade diretamente com material clínico (ex., urina e fluidos corpóreos normalmente estéreis) deve ser evitada, exceto em emergências clínicas, quando a coloração direta do gram sugere um único patógeno. Se o teste for efetuado diretamente com o material clínico, os resultados devem ser reportados como preliminares, repetindo-se o teste de sensibilidade usando

^a Algumas destas definições são encontradas na NRSCL8—*Terminology and Definitions for Use in NCCLS Documents* do NCCLS. Para definições completas e informações detalhadas sobre as fontes, favor reportar-se à edição mais atualizada dessa Norma.

a metodologia padronizada. Quando a natureza da infecção não está clara e o espécime contém crescimento misto ou flora normal, em que os organismos provavelmente têm pouca relação com o processo infeccioso que está sendo tratado, os testes de sensibilidade são freqüentemente desnecessários e os resultados podem ser enganadores.

A CIM obtida usando o teste de diluição pode mostrar ao médico qual a concentração do agente antimicrobiano necessária no sítio da infecção para inibir o organismo infectante. A CIM, entretanto, não representa um valor *absoluto*. A “verdadeira” CIM está num ponto entre a menor concentração do teste que inibe o crescimento do organismo (ou seja, a leitura da CIM) e a próxima menor concentração do teste. Por exemplo, se forem usadas diluições 2X e for determinado que a CIM é 16 µg/mL, a “verdadeira” CIM estará entre 16 e 8 µg/mL. Mesmo nas melhores condições controladas, o teste de diluição poderá não fornecer o mesmo ponto final toda vez que o teste é realizado. Em geral, a reprodutibilidade aceitável do teste fica dentro de uma diluição 2X do verdadeiro ponto final. Para evitar maior variabilidade, o teste de diluição deve ser normatizado e controlado cuidadosamente, conforme descrito nesta Norma.

As CIMs têm sido determinadas usando concentrações derivadas, tradicionalmente, de diluições 2X em série indexadas à base 1 (ex., 1, 2, 4, 8, 16 µg/mL, etc.). Utilizam-se também outros esquemas de diluição, incluindo o uso de apenas duas concentrações bem separadas, ou de “ponto de corte”, ou concentrações entre os valores usuais (ex., 4, 6, 8, 12, 16 µg/mL). Os resultados desses métodos alternativos podem ser igualmente úteis do ponto de vista clínico; embora alguns sejam mais difíceis de controlar (ver a Seção 12.3). Quando há inibição do crescimento na menor concentração testada, o verdadeiro valor da CIM não pode ser determinado com precisão e deve ser relatado como igual a ou menor que a menor concentração testada. Para aplicar os critérios de interpretação quando se testam as concentrações entre as diluições usuais, os resultados entre as diluições 2X em série devem ser arredondados para a concentração imediatamente superior (ex., uma CIM de 6 µg/mL se transformaria em 8 µg/mL).

Sempre que os resultados da CIM forem relatados aos clínicos com a finalidade de orientar a terapia, o resultado da CIM deve ser acompanhado por uma categoria de interpretação (ex., sensível, intermediária, ou resistente) baseada nos critérios apresentados nas Tabelas 2A a 2K e na Tabela 7. Nos testes de quatro ou menos concentrações consecutivas, ou quando são testadas concentrações não consecutivas, o relatório deverá incluir a categoria de interpretação do resultado. A faixa da CIM também pode ser incluída no relatório, se desejado.

3 Agentes Antimicrobianos

3.1 Fonte

Os pós antimicrobianos padrão ou de referência podem ser obtidos diretamente dos laboratórios farmacêuticos, da empresa United States Pharmacopoeia (12601 Twinbrook Parkway, Rockville, Maryland 20852, 800-227-8772), ou de algumas outras fontes comerciais. As preparações parenterais padrão não devem ser usadas para os testes de sensibilidade. Os pós aceitáveis apresentam o nome genérico da droga no rótulo, bem como sua potência (expressada, em geral, em microgramas [µg] ou Unidades Internacionais [UI] por mg de pó) e a data de vencimento. Os pós devem ser armazenados seguindo as instruções do fabricante, ou a $\leq -20^{\circ}\text{C}$, num dessecador (de preferência, no vácuo). Quando o dessecador é retirado da geladeira ou do congelador, deve permanecer a temperatura ambiente antes de ser aberto (para evitar a condensação de água).

3.2 Pesagem de Pós Antimicrobianos

Todos os agentes antifúngicos devem ser submetidos a um ensaio para determinar suas unidades padrão de atividade. As unidades do ensaio podem diferir amplamente do peso real do pó e, com freqüência,

diferem dentro de cada lote de produção da droga. Por isso, o laboratório deve normatizar suas soluções antifúngicas com base nos ensaios dos lotes de pós antifúngicos que estão sendo usados.

O valor de potência fornecido pelo fabricante deverá incluir consideração das medidas de pureza (em geral, por ensaio HPLC), teor de água (e.g., por análise de Karl Fischer ou por perda de peso na secagem) e a fração sal/contra-íon (quando o produto é fornecido em forma de sal ao invés de base ou ácido livre). A potência poderá ser expressada como percentual, ou em unidades de $\mu\text{g}/\text{mg}$ (w/w).

Em alguns casos, o fabricante anexa, ao pó antibiótico, um certificado de análise, com os valores de cada componente; nesse caso, não será fornecido, em geral, o valor geral da potencial, que poderá ser calculado a partir da pureza de HPLC, do teor de água e, quando aplicável, da fração ativa das drogas fornecidas na forma de sal (ex., hidrocloreto, mesilato). Entretanto, se ao aplicar esses cálculos, algum valor for desconhecido ou não claramente determinado com base no certificado de análise, recomenda-se que os fatores usados no cálculo sejam confirmados com o fornecedor ou fabricante. A seguir, apresenta-se um exemplo de cálculo:

Exemplo: meropenem tri-hidratado

Dados do certificado de análise:

Pureza de ensaio (por HPLC): 99,8%

Teor de água medido (por análise de Karl Fischer): 12,1% (w/w)

Fração ativa: 100% (fornecida na forma de ácido livre, e não sal)

Cálculo da potência a partir dos dados anteriores:

Potência = (Pureza de ensaio) x (Fração ativa) x (1 - Teor de água)

Potência = (0,998) x (1,0) x (1 - 0,121)

Potência = 0,877 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ou 87,7%

Ambas as equações a seguir podem ser usadas para determinar a quantidade de pó ou diluente necessária para a solução padrão:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência } (\mu\text{g}/\text{mg})} \quad (1)$$

ou

$$\text{Volume (mL)} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Potência } (\mu\text{g}/\text{mg})}{\text{Concentração } (\mu\text{g/mL})} \quad (2)$$

O pó antifúngico deve ser pesado numa balança analítica calibrada com pesos do National Institute of Standards and Technology (KIST [Gaithersburg, MD]) (ou outros pesos de referência aprovados). Se possível, recomenda-se pesar com precisão uma quantidade de agente antifúngico em excesso do necessário e calcular o volume de diluente necessário para obter a concentração desejada, como na equação (2), anterior.

Exemplo: Para preparar 100mL de uma solução padrão contendo 1.280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de agente antimicrobiano com um pó antimicrobiano cuja potência é de 750 $\mu\text{g}/\text{mg}$, deve-se pesar, com precisão, de 170 a 200mg do pó antimicrobiano. Se o peso real for 182,6mg, o volume necessário de diluente será o seguinte:

$$\text{Volume (mL)} = \frac{182,6 \text{ mg} \cdot 750 \mu\text{g}/\text{mg}}{1.280 \mu\text{g}/\text{mL}} = 107,0 \text{ mL} \quad (3)$$

(Concentração Desejada)

Assim, os 182,6mg de pó antimicrobiano serão dissolvidos em 107,0mL de diluente.

3.3 Preparação de Soluções Padrão

As soluções padrão de agente antimicrobiano são preparadas em concentrações de, pelo menos, 1.000µg/mL (exemplo: 1.280µg/mL) ou dez vezes a concentração mais alta a ser testada, das duas a maior. Existem alguns agentes antimicrobianos de solubilidade limitada, porém, que podem precisar de concentrações mais baixas. Em todos os casos, as informações fornecidas pelo fabricante da droga devem ser consideradas na determinação da solubilidade.

Algumas drogas devem ser dissolvidas em solventes que não água. Nesses casos:

- deve-se usar uma quantidade mínima de solvente para solubilizar o pó antimicrobiano;
- pode-se fazer a concentração final da solução padrão com água ou o diluente apropriado, conforme indicado na Tabela 4; e
- no caso de solventes potencialmente tóxicos, deve-se consultar as folhas de dados de segurança do material (MSDS) disponibilizadas pelo fabricante (ver a Tabela 4).

Uma vez que a contaminação microbiana é extremamente rara, as soluções não esterilizadas são, em geral, aceitáveis. Se desejado, porém, pode-se esterilizar as soluções por meio de membrana-filtro. Os filtros de papel, amianto, ou vidro sinterizado, que podem absorver quantidades apreciáveis de certos agentes antimicrobianos, não devem ser usados. Sempre que se usar filtração, é importante documentar a ausência de absorção por meio dos resultados de ensaios apropriados.

Pequenos volumes de soluções padrão estéreis podem ser colocados em frascos estéreis de vidro, polipropileno, ou polietileno, selados cuidadosamente e armazenados (de preferência a temperatura de -60° C ou menos, mas nunca a temperaturas superiores a -20° C). Os frascos são retirados conforme necessário e usados no mesmo dia. Qualquer droga não usada deve ser descartada no fim do dia. As soluções padrão da maioria dos agentes antimicrobianos podem ser armazenadas a -60° C, ou menos, durante seis meses, ou mais, sem perda significativa de atividade. Em todo caso, qualquer orientação fornecida pelo fabricante da droga deve ser considerada como parte destas recomendações gerais. Qualquer deterioração significativa do agente antifúngico poderá se refletir nos resultados dos testes de sensibilidade usando cepas de controle de qualidade.

3.4 Número de Concentrações Testadas

As concentrações testadas para um determinado agente antimicrobiano devem abranger os pontos de corte de interpretação nas Tabelas 2A a 2K, mas os laboratórios devem decidir qual será o número de concentrações a ser testado. Entretanto, recomenda-se escolher uma faixa que permita que, pelo menos, um organismo de controle de qualidade tenha valores dentro da escala. Concentrações singulares podem ser testadas para finalidades especiais (ex., altas concentrações de gentamicina e estreptomicina podem ser testadas para determinar se há um efeito sinérgico com um antibiótico de penicilina ou glicopeptídeo contra enterococos.).

4 Seleção dos Agentes Antimicrobianos para Testes e Relatórios de Rotina

Em cada instituição, a seleção dos agentes antimicrobianos mais apropriados para testes e relatórios de rotina cabe aos laboratórios de patologia clínica, em consulta com os especialistas em doenças infecciosas e o farmacêutico, assim como os comitês de terapêutica e de controle de infecções do corpo médico. As

recomendações nas Tabelas 1 e 1A para cada grupo de organismos abrangem agentes de eficácia comprovada que apresentam desempenho aceitável em testes *in vitro*.

Na designação de agentes para grupos específicos de testes/relatórios, deve-se considerar a prevalência de resistência, a minimização do surgimento de resistência, o custo, as indicações do FDA e as recomendações consensuais em vigor para drogas de primeira escolha e alternativas, além das questões específicas descritas. Os testes de seleção de agentes podem ser úteis para fins de controle de infecções.

4.1 Relatórios de Rotina

As listas de agentes nas Tabelas 1 e 1A constituem recomendações para testes e relatórios de rotina consideradas apropriadas no presente momento. Para evitar interpretações equivocadas, os relatórios rotineiros aos médicos devem incluir apenas as drogas apropriadas para uso terapêutico, conforme sugerido nas Tabelas 1 e 1A. Deve-se acrescentar ou retirar agentes antimicrobianos conforme a situação exigir. Pode-se testar outras drogas, além das consideradas apropriadas para uso terapêutico, para obter dados taxonômicos e informações epidemiológicas, mas essas drogas não devem ser incluídas nos relatórios de patologia clínica. Entretanto, esses resultados devem ser disponibilizados no laboratório para uso dos especialistas em controle de infecções e/ou o epidemiologista hospitalar.

4.2 Nomes Genéricos

Para minimizar confusões, deve-se usar os nomes não-proprietários oficiais (ex., genérico) de todos os agentes antimicrobianos. Para enfatizar a correlação de muitas das drogas atualmente disponíveis, elas podem ser agrupadas por classe de droga, conforme indicado a seguir.

4.2.1 β -Lactâmicos

Todos os agentes antimicrobianos β -lactâmicos compartilham um anel central β -lactâmico de quatro membros comum, sendo seu principal modo de ação a inibição da síntese da parede celular. Estruturas adicionais em anel ou grupos substitutivos acrescentados ao anel β -lactâmico determinam se o agente é, ou não, penicilina, cefem, carbapenem, ou monobactam.

4.2.1.1 Penicilinas

O espectro de atividade da penicilina inclui, principalmente, bactérias gram-negativas gram-positivas e algumas fastidiosas que não produzem β -lactamase. As aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina) são ativas contra espécies gram-negativas adicionais, incluindo alguns membros das Enterobacteriaceae. As carboxipenicilinas (carbenicilina e ticarcilina) e ureidopenicilinas (mezlocilina e piperacilina) possuem um espectro gram-negativo consideravelmente maior, incluindo atividade contra numerosos *Pseudomonas* e *Burkholderia* spp. As penicilinas penicilinase-resistentes (cloxacilina, dicloxacilina, metilina, nafcilina e oxacilina) têm um espectro predominantemente gram-positivo, que inclui os estafilococos produtores de penicilinase.

4.2.1.2 Combinações β -Lactâmico/Inibidor da β -Lactamase

Essas combinações de antimicrobianos incluem a penicilina e um segundo agente que tem atividade antibacteriana mínima, mas funciona como inibidor de algumas β -lactamases. Atualmente, três inibidores da β -lactamase são utilizados: o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Os resultados de testes de apenas a parte penicilina da combinação contra organismos produtores de β -lactamase com frequência não prediz a sensibilidade à combinação das duas drogas.

4.2.1.3 Cefens (incluindo Cefalosporinas)

Os diferentes agentes antimicrobianos cefens podem ter um espectro de atividade ligeiramente diferente contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas. Essa classe de antimicrobianos, os cefens, inclui as clássicas cefalosporinas, assim como os agentes nas subclasses cefamicina, oxacefem e carbacefem (ver o Glossário I). As diversas cefalosporinas são, com frequência, denominadas cefalosporinas de “primeira”, “segunda”, “terceira” ou “quarta” geração, com base no seu grau de atividade contra as bactérias gram-negativas resistentes a antibióticos. Nem todos os representantes de um grupo ou geração específico possuem necessariamente o mesmo espectro de atividade. Devido a essas diferenças em atividade, os representantes de cada grupo podem ser selecionados para testes de rotina.

4.2.1.4 Carbapenems

A estrutura dos carbapenems difere ligeiramente da das penicilinas, sendo que os primeiros são muito mais resistente à hidrólise por β -lactamase, o que lhes dá um amplo espectro de atividade contra muitas bactérias gram-positivas e gram-negativas.

4.2.1.5 Monobactams

Os agentes antimicrobianos monobactams são β -lactâmicos monocíclicos. Atualmente, o aztreonam, que possui atividade contra as bactérias aeróbicas gram-negativas, é o único monobactam aprovado pelo FDA para uso nos Estados Unidos.

4.2.2 Glicopeptídeos

Os antimicrobianos glicopeptídeos têm em comum uma estrutura química complexa, sendo seu principal modo de ação a inibição da síntese da parede celular num sítio diferente do dos β -lactâmicos. A atividade deste grupo de agentes antimicrobianos é dirigida às bactérias gram-positivas. A vancomicina é um agente antimicrobiano aceito para tratamento de infecções bacterianas gram-positivas em pacientes alérgicos a penicilina, sendo útil em infecções por cepas bacterianas gram-positivas resistentes aos β -lactâmicos, ao *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente (MRSA) e a alguns enterococos.

4.2.3 Aminoglicosídeos

Os membros desse grupo de agentes antimicrobianos estruturalmente afins inibem a síntese protéica das bactérias em nível de ribossoma. Essa classe inclui membros afetados em diferentes graus pelas enzimas que inativam os aminoglicosídeos, o que provoca algumas diferenças de espectro entre os agentes. Os aminoglicosídeos são usados, principalmente, para tratar infecções por bastões gram-negativos aeróbios ou em combinações sinérgicas com agentes antimicrobianos ativos na parede celular (ex., penicilina, ampicilina e vancomicina) contra algumas bactérias gram-positivas resistentes, como os enterococos.

4.2.4 Macrolídeos

Os macrolídeos são agentes antimicrobianos estruturalmente afins que inibem a síntese protéica em nível ribossômico. Existem vários membros desta classe em uso atualmente que poderia ser necessário considerar para testes contra isolados de bactérias gram-negativas, gram-positivas ou fastidiosas. As drogas neste grupo estão estreitamente relacionadas e, com poucas exceções, só é necessário testar rotineiramente com eritromicina.

4.2.5 Tetraciclina

As tetraciclina inibem a síntese protéica, em nível ribossômico, de certas bactérias gram-positivas e gram-negativas. As drogas neste grupo estão estreitamente relacionadas e, com poucas exceções, só é

necessário testar a tetraciclina de forma rotineira. Os organismos sensíveis à tetraciclina também são considerados sensíveis a doxiciclina e minociclina. Entretanto, alguns organismos de sensibilidade intermediária ou resistentes à tetraciclina podem ser sensíveis a doxiciclina ou minociclina, ou a ambas.

4.2.6 Quinolonas

Esse grupo de produtos (quinolonas e fluoroquinolonas) inclui um número de agentes estreitamente relacionados cujo principal modo de ação é a inibição da atividade da DNA-girase de muitas bactérias gram-positivas e gram-negativas. Uma vez que existem algumas diferenças no espectro de atividade, pode ser necessário testar individualmente os agentes.

4.2.7 Inibidores da Via Metabólica do Folato

Esse grupo de produtos abrange vários agentes quimioterápicos com espectros de atividade similares resultantes da inibição da via metabólica bacteriana dos folatos. O sulfisoxazole está entre as sulfonamidas mais frequentemente empregadas nas infecções do trato urinário; portanto, pode ser o agente apropriado para os testes *in vitro*. Em geral, o sulfametoxazol é testado em combinação com a trimetoprim, em que ocorre uma inibição sequencial de dois passos na via metabólica dos folatos em algumas bactérias gram-positivas e gram-negativas.

4.2.8 Classes de Drogas Únicas

Para os seguintes agentes antimicrobianos não existem outros produtos relacionados apropriados para testes *in vitro*. Incluem cloranfenicol, clindamicina, linezolida e quinupristin-dalfopristin, que inibem a síntese protéica, assim como rifampina, que inibe a síntese de RNA. A nitrofurantoína, usada apenas no tratamento de infecções do trato urinário, age inibindo a síntese de várias proteínas e em nível ribossômico. A fosfomicina, também aprovada pelo FDA para infecções no trato urinário, inibe as enzimas envolvidas na síntese da parede celular.

4.3 Diretrizes de Seleção

Para que os testes rotineiros de sensibilidade sejam relevantes e práticos, o número de agentes testados precisa ser limitado. As Tabelas 1 e 1A neste documento relacionam aquelas drogas que preenchem os requisitos básicos de uso rotineiro na maioria dos laboratórios de patologia clínica. As tabelas estão divididas em colunas baseadas em organismos específicos ou grupos de organismos, indicando-se, a seguir, as diferentes drogas em ordem de prioridade de teste, de maneira a auxiliar os laboratórios na seleção das baterias de testes de rotina. As caixas na tabelas designam grupos de agentes comparáveis que, em geral, não precisam ser duplicados nos testes, porque seus resultados interpretativos são geralmente similares e sua eficácia clínica, semelhante. Além disso, a palavra “ou” designa um grupo conexo de agentes que apresentam espectro de atividade e resultados interpretativos quase idênticos e para os quais existe quase total resistência e sensibilidade cruzadas. Portanto, só é necessário selecionar um dos agentes antimicrobianos em cada caixa de seleção (agrupamento ou grupo conexo) para os testes. Com poucas exceções, o agente relatado deverá ser testado, exceto quando relatar com base em testes de outro agente fornece um resultado mais preciso (ex., sensibilidade de estafilococos aos cefens com base em testes de oxacilina). Os agentes testados devem ser os mesmos incluídos no formulário do hospital ou, então, os relatórios devem incluir notas de rodapé indicando quais outros agentes não testados poderão ter atividade análoga.

4.4 Sugestão de Diretrizes para Testes e Relatórios de Rotina

Conforme relacionado nas tabelas 1 e 1A, os agentes no Grupo A são considerados apropriados para inclusão num painel de testes primários de rotina, assim como os relatórios rotineiros dos resultados de grupos específicos de organismos.

O Grupo B inclui agentes clinicamente importantes (particularmente para as infecções nosocomiais) que podem justificar testes primários. Entretanto, os relatórios podem ser seletivos, como quando o organismo é resistente a agentes antimicrobianos da mesma classe, como no Grupo A. Outras indicações para relatar resultados podem incluir fontes selecionadas de espécimes [ex., uma cefalosporina de terceira geração contra bacilos entéricos provenientes de fluido cerebrospinal (LCR) ou sulfametoxazol-trimetoprim contra isolados do trato urinário]; infecções polimicrobianas; infecções que afetam múltiplos sítios corpóreos; mediante solicitação, em casos de alergia, intolerância, ou falta de resposta a um agente no Grupo A; ou para fornecer informações ao pessoal de controle de infecções, como ferramenta epidemiológica.

O Grupo C inclui agentes antimicrobianos alternativos ou complementares que devem ser testados em instituições afetadas por cepas endêmicas ou epidêmicas resistentes a várias drogas primárias (especialmente na mesma classe, ex., β -lactâmicos ou aminoglicosídeos); para tratamento de pacientes alérgicos a drogas primárias; para tratamento de organismos incomuns (ex., cloranfenicol para isolados extra-intestinais de *Salmonella* spp. ou enterococos resistentes a vancomicina); ou para fornecer informações ao pessoal de controle de infecções, como ferramenta epidemiológica.

O Grupo U relaciona certos agentes antimicrobianos (ex., nitrofurantopina e certas quinolonas) usadas, principalmente, no tratamento de infecções do trato urinário; não é necessário emitir relatórios rotineiros sobre a ação desses agentes contra patógenos recuperados em outros sítios de infecção. Outros agentes com indicações mais amplas podem ser incluídos no Grupo U contra patógenos específicos do trato urinário (ex., *P. aeruginosa*).

O Grupo O (“outros”) inclui agentes que possuem indicação clínica para o grupo de organismos, mas que, em geral, não são candidatos para testes e relatórios de rotina nos Estados Unidos.

O Grupo Inv. (“investigação”) inclui agentes que estão sendo pesquisados para o grupo de organismos, mas ainda não foram aprovados pelo FDA.

Cada laboratório deve decidir quais dos agentes relacionados nas Tabelas 1 e 1A devem ser objeto de relatório rotineiro (Grupo A) e para quais se deve preparar relatórios seletivos (no Grupo B), em consulta com os especialistas em doenças infecciosas e o farmacêutico, assim como os comitês de farmácia, terapêutica e controle de infecções do corpo médico do hospital. Os relatórios seletivos podem ajudar a melhorar a relevância clínica dos relatórios de resultados e a minimizar a seleção de cepas nosocomiais multirresistentes resultantes do uso excessivo de agentes antimicrobianos de amplo espectro. No caso dos agentes do Grupo B, os resultados que não forem liberados rotineiramente deverão ser disponibilizados mediante solicitação, ou poderão ser liberados para espécimes selecionados. Resistência inesperada, quando confirmada, deve ser relatada, e.g., resistência a um agente secundário, mas sensibilidade a um agente primário.

5 Preparação do Inóculo para Testes de Diluição

5.1 Padrão de Turbidez para a Preparação do Inóculo

Para padronizar a densidade do inóculo para um teste de sensibilidade, deve-se usar um controle de turbidez de BaSO₄, equivalente a uma solução padrão McFarland de 0,5 ou seu equivalente óptico (ex., suspensão de partículas de látex). A solução padrão McFarland de 0,5 de BaSO₄ pode ser preparada da seguinte maneira.

(1) Acrescenta-se uma alíquota de 0,5mL de BaCl₂ de 0.048 mol/L (1,175% (p)/v BaCl₂ • 2H₂O) a 99,5mL de H₂SO₄ de 0,18 mol/L (1% v/v), mexendo constantemente para manter a suspensão.

- (2) A densidade correta do controle de turbidez deve ser verificada usando um espectrofotômetro com fonte de luz de 1cm e cubetas apropriadas para determinar a absorvância. A absorvância em 625nm deverá variar de 0,08 a 0,10 para a solução padrão McFarland de 0,5.
- (3) A suspensão de sulfato de bário deve ser transferida, em alíquotas de 4 a 6mL, para tubos com tampas de rosca do mesmo tamanho usado para cultivar e diluir o inóculo bacteriano.
- (4) Esses tubos devem ser selados hermeticamente e armazenados em local escuro, a temperatura ambiente.
- (5) O controle de turbidez de sulfato de bário deve ser agitado vigorosamente num misturador mecânico tipo vórtex antes de cada uso, verificando-se se está uniformemente túrbido. No caso de partículas maiores, o controle deve ser substituído. As suspensões de partículas de látex devem ser misturadas invertendo-as suavemente, e não num misturado tipo vórtex.
- (6) Os controles de sulfato de bário devem ser substituídos, ou suas densidades verificadas, todo mês.

5.2 Método de Crescimento

- (1) Seleciona-se, pelo menos, de três a cinco colônias, bem isoladas, do mesmo tipo morfológico de cultura em placa de ágar. Toca-se o topo de cada colônia com uma alça, transferindo-se os microorganismos para um tubo contendo 4-5mL de um meio de cultura adequado, como caldo de soja tríptica.
- (2) Incuba-se a cultura em caldo, a 35° C, até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão McFarland de 0,5 (em geral, de duas a seis horas).
- (3) Ajusta-se a turbidez da cultura em caldo em crescimento ativo com solução salina estéril ou caldo, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão McFarland de 0,5. Isso resulta numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL de *E. coli* ATCC® 25922. Para realizar essa operação corretamente, emprega-se um espectrômetro ou, quando executado a olho nu, luz suficiente para comparar o tubo de inóculo e a solução padrão McFarland de 0,5 contra um cartão de fundo branco e linhas contrastantes pretas.

5.3 Método de Suspensão Direta das Colônias

- (1) Como alternativa conveniente para o método de crescimento, pode-se preparar o inóculo fazendo uma suspensão direta, em caldo ou solução salina, de colônias isoladas selecionadas numa placa de ágar de 18-24 horas (deve-se usar um meio não seletivo, como ágar sangue). A suspensão é ajustada para que sua turbidez coincida com a da solução padrão McFarland de 0,5 conforme delineado na Seção 5.2.
- (2) Recomenda-se este método para testar os organismos fastidiosos, *Haemophilus* spp. e *Neisseria gonorrhoeae*, bem como os estreptococos (ver Seção 8), e para testar possível resistência dos estafilococos a meticilina ou oxacilina.

6 Teste de Diluição em Ágar

A metodologia do teste de sensibilidade antimicrobiana por diluição em ágar é uma técnica bem estabelecida.^{1,2} O agente antimicrobiano é incorporado ao meio ágar, sendo que cada placa contém uma concentração diferente do agente. Os inóculos podem ser aplicados rápida e simultaneamente às superfícies de ágar usando um aparelho de replicação de inóculo.³ A maioria dos aplicadores usada atualmente permite a transferência de 32 a 36 inóculos para cada placa.

6.1 Reagentes e Materiais

6.1.1 Meio Ágar Mueller-Hinton

Dentre os muitos meios disponíveis, o subcomitê considera o ágar Mueller-Hinton o melhor para testes rotineiros de sensibilidade contra bactérias não fastidiosas, pelas seguintes razões.

- Apresenta reprodutibilidade aceitável entre lotes nos testes de sensibilidade.
- Contém baixos teores de inibidores de sulfonamida, trimetoprim e tetraciclina.
- Produz crescimento satisfatório da maioria dos patógenos.
- Existe um grande acervo de dados e experiências relativos a testes de sensibilidade realizados com esse meio.

Embora o ágar Mueller-Hinton seja geralmente confiável para uso nos testes de sensibilidade, os resultados obtidos com alguns lotes podem variar, ocasionalmente, de maneira significativa. Deve-se usar apenas formulações do meio Mueller-Hinton que tenham sido testadas de acordo com o documento M6—*Protocols for Evaluating Dehydrated Mueller-Hinton Agar* do NCCLS e atendam aos limites de aceitação descritos nesse documento.

(1) Deve-se testar o desempenho de lotes novos do meio antes de usar conforme delineado na Seção 12.5.

(2) Deve-se preparar o ágar Mueller-Hinton a partir de uma base desidratada seguindo as instruções do fabricante. Após autoclavado, o ágar deve esfriar em banho-maria a 45-50° C, antes de se acrescentar, assepticamente, as soluções antimicrobianas e os suplementos lábeis ao calor e colocá-lo, posteriormente, nas placas (ver a Seção 6.2).

(3) O pH de cada lote de ágar Mueller-Hinton deve ser verificado quando o meio é preparado. O método exato a ser usado dependerá, em grande parte, do tipo de equipamento disponível no laboratório. O meio ágar deve ter pH entre 7,2 e 7,4 a temperatura ambiente após gelificar. Se o pH for demasiado baixo, algumas drogas parecerão ter perdido sua potência (ex., aminoglicosídeos, quinolonas e macrolídeos), enquanto que outros agentes poderão parecer excessivamente ativos (ex., tetraciclinas). Se o pH for demasiado alto, pode-se esperar os efeitos opostos. O pH pode ser verificado das seguintes maneiras.

- Macerar uma quantidade suficiente de ágar para submergir a ponta de um eletrodo de pH.
- Permitir que uma pequena quantidade de ágar solidifique em torno da ponta de um eletrodo de pH, num béquer ou xícara.
- Usar um eletrodo de superfície devidamente calibrado.

(4) Não se deve acrescentar cátions suplementares ao ágar Mueller-Hinton. No caso de testes de oxacilina, meticilina, ou nafcilina contra estafilococos, deve-se acrescentar NaCl (2% p/v).

(5) O ágar Mueller-Hinton pode ser suplementado com sangue lisado de cavalo ou sangue desfibrinado de carneiro a 5% (v/v), conforme descrito nas Tabelas 2H, 3A e 7. O pH é verificado após o acréscimo, em condições assépticas, do sangue ao meio autoclavado e resfriado. O pH final deverá ser o mesmo do ágar Mueller-Hinton sem suplemento.

(6) O meio apropriado para testes de diluição em ágar de *Neisseria gonorrhoeae* é a base ágar GC com suplemento de crescimento definido.⁴

(7) As Seções 8 e 9, assim como a Tabela 7, contêm informações adicionais sobre testes de diluição ou testes especiais de triagem para alguns organismos fastidiosos ou problemáticos.

6.1.2 Aplicadores de Inóculo

A maioria dos aplicadores de inóculo disponíveis transferem de 32 a 36 inóculos para cada placa.² Os aplicadores com pontas de 3mm de diâmetro aplicam aproximadamente 2 μ L (faixa de 1 a 3 μ L) na superfície de ágar. Os aplicadores com pontas menores, de 1mm, aplicam dez vezes menos, aproximadamente de 0,1 a 0,2 μ L.⁵

6.2 Preparação da Diluição em Placas de Ágar

6.2.1 Procedimento

(1) Acrescentam-se diluições apropriadas de solução antimicrobiana a ágars derretidos que se permitiu chegar ao equilíbrio em banho-maria a temperaturas de 45 a 50° C.

(2) O ágar e a solução antimicrobiana são misturados completamente e a mistura colocada em placas de Petri numa superfície até se obter uma camada de ágar de 3-4mm de profundidade.

(3) As placas devem ser produzidas o mais rapidamente possível após misturar, para evitar o resfriamento e solidificação parcial do ágar no misturador. Deve-se evitar a formação de bolhas.

(4) O ágar deve solidificar a temperatura ambiente e as placas devem ser usadas imediatamente, ou armazenadas em sacos de plástico a temperatura de 2-8° C, durante até cinco dias para trabalho de referência, ou mais tempo para testes de rotina. Num estudo, placas de ágar contendo cefaclor tiveram de ser preparadas dentro de um período de 48 horas devido à degradação da droga, enquanto que o cefamandole permaneceu estável por um período superior aos cinco dias recomendados.⁶ Outras drogas particularmente lábeis, além do cefaclor, são ampicilina, meticilina, imipenem e ácido clavulânico.

OBSERVAÇÃO: Não se pode presumir que todos os agentes antimicrobianos manterão sua potência nessas condições de armazenamento. O usuário deverá, portanto, avaliar a estabilidade das placas a partir dos resultados obtidos com cepas de controle e desenvolver critérios relativos à validade em condições de armazenamento. Algumas vezes, essa informação pode ser obtida das empresas farmacêuticas.

(5) As placas armazenadas a temperaturas de 2 a 8° C devem ser mantidas a temperatura ambiente até chegar ao equilíbrio antes de serem usadas. Certifique-se de que a superfície de ágar está seca antes de inocular as placas. Se necessário, as placas podem ser colocadas num incubador ou câmara de fluxo laminar durante aproximadamente 30 minutos, semi-destampadas, para acelerar a secagem da superfície de ágar.

6.2.2 Esquema de Diluição para Testes de Referência

Em geral, deve-se usar um esquema em que uma parte de solução antimicrobiana é acrescentada a nove partes de ágar líquido, conforme indicado na Tabela 5.

6.2.3 Freqüência do Controle de Qualidade

Embora seja aceitável realizar controle de qualidade semanalmente, conforme de descrito nesta Norma, algumas combinações droga/ágar podem exigir testes mais freqüentes, ex., as drogas lábeis descritas na Seção 6.2.1, anterior. Ver a Seção 12 para mais detalhes.

6.2.4 Placas de Controle

Deve-se usar placas sem droga preparadas a partir do meio base (com ou sem suplementos, conforme indicado na Seção 6.1.1) para cultivar os controles.

6.3 Preparação do Inóculo

6.3.1 Preparação do Inóculo

Pode-se preparar um inóculo padrão para os testes de diluição em ágar seja cultivando o microorganismo até uma turbidez equivalente à solução padrão de McFarland 0,5 ou suspendendo as colônias diretamente para conseguir a mesma densidade descrita na Seção 5. A preparação do inóculo inicial e da diluição final pode variar no caso de certos organismos fastidiosos, como *Helicobacter pylori* (ver a Tabela 2J).

6.3.2 Diluição da Suspensão de Inóculo

As culturas ajustadas ao padrão McFarland 0,5 contêm aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL com a maioria das espécies, sendo o inóculo final necessário de 10^4 UFC por ponto de 5 a 8mm de diâmetro. Quando se usa aplicador com pontas de 3mm que aplicam $2\mu\text{L}$, a suspensão de McFarland 0,5 deve ser diluída 1:10 em caldo ou solução salina estéreis para obter uma concentração de 10^7 UFC/mL. O inóculo final em ágar terá, então, aproximadamente 10^4 UFC por ponto. No caso dos aplicadores com pontas de 1mm, que aplicam de 0,1 a $0,2\mu\text{L}$, não se deve realizar suspensão inicial. No melhor dos mundos, as suspensões ajustadas devem ser usadas na inoculação final até 15 minutos após a preparação.

6.4 Diluição de Inoculação em Placas de Ágar

(1) Os tubos contendo as suspensões bacterianas ajustadas e diluídas (10^7 UFC/mL) devem ser arrumados em ordem no suporte. Acrescenta-se uma alíquota de cada suspensão bem misturada no correspondente poço no bloco do aplicador de inóculo.

(2) As placas de ágar são marcadas para orientar os pontos de inóculo.

(3) Cada alíquota de cada inóculo é aplicada à superfície de ágar, por meio de um aparelho de aplicação de inóculos ou alças ou pipetas padronizadas. É imprescindível diluir adequadamente a suspensão de inóculo em função do volume de inóculo aplicado, a fim de obter uma concentração final de 10^4 UFC/ponto (ver a Seção 6.3.2).

(4) Primeiramente, inocula-se uma placa de controle do crescimento (sem agente antimicrobiano) e, a seguir, começando pela concentração mais baixa, inoculam-se as placas contendo as diferentes concentrações de antimicrobiano. Por último, inocula-se uma segunda placa de controle do crescimento para verificar se houve contaminação ou transferência significativa de antimicrobiano durante a inoculação.

(5) Esfrega-se uma amostra de cada inóculo numa placa apropriada de ágar, incubando-a durante a noite para detectar culturas mistas e fornecer colônias recém isoladas, caso seja necessário realizar novamente o teste.

6.5 Incubação e Diluição em Placas de Ágar

(1) As placas inoculadas devem permanecer em temperatura ambiente até que a umidade nos pontos de inóculo tenha sido absorvida pelo ágar, i.e., até os pontos secarem, mas nunca mais de 30 minutos. A seguir, as placas são invertidas e incubadas, a 35° C, por um período de 16 a 20 horas (ver a Seção 9 para *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente e *Enterococcus* vancomicina-resistente, assim como a Tabela 7, para outras exceções).

(2) Nos testes de organismos não fastidiosos, não se deve incubar as placas numa atmosfera com maior concentração de CO₂, pois o pH da superfície pode ser alterado. Entretanto, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* e os estreptococos devem ser incubados em atmosfera contendo 5% de CO₂ (ver a Seção 8 e as Tabelas 2F, 2H e 7). *Helicobacter pylori* deve ser incubado em atmosfera microaeróbica (ver a Tabela 2J).

6.6 Determinação dos Pontos Finais nos Testes de Diluição em Ágar

(1) As placas devem ser colocadas numa superfície escura, não refletiva, para determinar os pontos finais. A CIM é registrada como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento, descartando qualquer colônia única ou turvação leve causada pelo inóculo. Com trimetoprim e as sulfonamidas, os antagonistas no meio podem permitir um pequeno crescimento e, portanto, o ponto final deve ser lido na concentração em que houver uma redução de 80%, ou mais, no crescimento, em comparação com o controle.

(2) Se duas ou mais colônias persistirem em concentrações do agente além do ponto final óbvio, ou se não houver crescimento em concentrações mais baixas, e sim em concentrações mais altas, será necessário verificar a pureza da cultura e, possivelmente, repetir o teste.

7 Testes de Diluição em Caldo (Macrodiluição e Microdiluição)

7.1 Meio Caldo de Mueller-Hinton

(1) Recomenda-se o caldo de Mueller-Hinton como meio de primeira escolha para testes de sensibilidade de organismos facultativos ou organismos aeróbios de crescimento rápido mais comumente isolados.¹ O caldo Mueller-Hinton apresenta uma boa reprodutibilidade entre lotes nos testes de sensibilidade; possui baixos teores de inibidores de sulfonamida, trimetoprim e tetraciclina; e produz crescimento satisfatório da maioria dos patógenos. Além disso, há um grande acervo de dados e experiências sobre testes realizados com esse meio. O caldo de Mueller-Hinton pode ser suplementado para suportar o crescimento de bactérias fastidiosas. Por exemplo, recomenda-se o Meio de Teste *Haemophilus*⁷ para testes de *Haemophilus* spp. Deve se acrescentar sangue para os testes de estreptococos. As Seções 8 e 9 e as Tabelas 2E, 2F, 2G, 2H e 7 fornecem recomendações específicas de suplementação do meio de Mueller-Hinton para suportar o crescimento de organismos fastidiosos ou problemáticos.

(2) A realização dos testes de CIM e as características químicas do caldo de Mueller-Hinton devem ser monitoradas de maneira rotineira. O pH de cada lote de caldo de Mueller-Hinton deve ser verificado com um medidor de pH após a preparação do meio; o pH deverá ser de 7.2 a 7.4 a temperatura ambiente (25° C).

(3) Se o caldo de Mueller-Hinton não tiver as concentrações corretas dos cátions divalentes Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ [de 20 a 25mg de Ca⁺⁺/L (50mg/L nos testes de daptomicina) e de 10 a 12,5mg de Mg⁺⁺/L], as CIMs dos aminoglicosídeos para *P. aeruginosa* e as de tetraciclina para todas as bactérias, bem como as CIMs de

daptomicina para os organismos gram-positivos, serão diferentes dos obtidos com ágar Mueller-Hinton. Alguns fabricantes fornecem caldo de Mueller-Hinton com o teor de cátions já ajustado. Portanto, as instruções para o ajuste dos cátions, a seguir, devem ser seguidas apenas quando o fabricante do caldo de Mueller-Hinton inicial tiver certificado, ou o usuário tiver verificado, que o caldo fornecido não contém qualquer Ca^{++} ou Mg^{++} , ou qualquer quantidade inadequada desses cátions, quando submetido a ensaios de espectrometria de absorção para determinar o teor total de cátions divalentes. O acréscimo de quantidade excessiva de cátions ao caldo de Mueller-Hinton pode levar a resultados errôneos; entretanto, nos testes de daptomicina, o caldo precisa ser suplementado com 50mg/L de Ca^{++} .

Ajuste de Cátions do Caldo de Mueller-Hinton

(a) Para preparar uma solução padrão de magnésio, dissolver 8,36g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 100mL de água desionizada. Essa solução contém 10mg de Mg^{++} /mL.

(b) Para preparar uma solução padrão de cálcio, dissolver 3,68g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 100mL de água desionizada. Essa solução contém 10mg de Ca^{++} /mL.

As soluções padrão devem ser esterilizadas mediante filtração através de membrana e armazenadas a temperatura de 2 a 8° C.

(c) O caldo de Mueller-Hinton deve ser preparado conforme as instruções do fabricante, autoclavado e resfriado durante a noite em temperatura de 2 a 8° C ou num banho de gelo antes de se acrescentar os cátions, se for usado no mesmo dia. É comum o meio desidratado preparado comercialmente conter pequenas quantidades de Ca^{++} ou Mg^{++} . Essa concentração inicial de cátions deve ser considerada ao calcular a quantidade de Ca^{++} ou Mg^{++} a ser acrescentada ao meio.

(d) Agitando sempre, acrescenta-se 0,1mL de solução padrão fria de Ca^{++} ou Mg^{++} por litro de caldo, para cada incremento de 1 mg/L desejado na concentração final do caldo Mueller-Hinton ajustado. Esse meio é denominado “caldo Mueller-Hinton de cátion ajustado-CAMHB”. Os ajustes de Ca^{++} ou Mg^{++} , ou ambos, não são necessários quando o caldo Mueller-Hinton recebido do fabricante já contém as concentrações corretas [de 20 a 25mg de Ca^{++} /L (50mg/L para daptomicina) e de 10 a 12,5mg de Mg^{++} /L] de cátions divalentes.

(4) O caldo de Mueller-Hinton pode ser suplementado com sangue lisado de cavalo (SLC) de 2 a 5% (v/v). Para preparar o sangue lisado de cavalo, congele e descongele sangue desfibrinado de cavalo até que o sangue esteja totalmente lisado (de cinco a sete vezes, aproximadamente). Misture, asépticamente, volumes iguais de sangue lisado e água destilada esterilizada (agora 50% SLC). Para usar no teste de caldo, a combinação de caldo e SLC deve estar transparente, o que pode ser conseguido centrifugando o SLC a 50% a 12.000 x g, durante 20 minutos. Decante o supernatante e centrifugue novamente, se necessário. Acrescente as quantidades corretas de SLC a 50% ao meio caldo para obter uma concentração final de SLC de 2 a 5%. O pH é verificado após o acréscimo asséptico do sangue ao meio autoclavado e resfriado. O sangue pode ser acrescentado às placas de microdiluição quando é inicialmente dispensado, ou após descongelar e logo antes da inoculação. Quando acrescentado após a preparação das placas, o sangue deve ser acrescentado junto com o inóculo, de maneira a evitar diluição adicional do agente antimicrobiano na placa (ver a Seção 7.3.2.2) e assegurar uma concentração final de SLC no poço de 2 a 5%.

(5) As características de desempenho dos testes de CIM para cada lote de caldo são avaliadas usando um conjunto padrão de organismos de controle (ver a Seção 12.3). Se um lote novo de caldo de Mueller-Hinton não produzir as CIMs esperadas, será necessário investigar o teor de cátions, além das outras variáveis e dos componentes do teste.

(6) Para determinar a adequabilidade do meio para testes de sulfonamida e trimetoprim, os testes de CIM podem ser realizados com *Enterococcus faecalis* ATCC^{®b} 29212. Os pontos finais devem ser fáceis de ler (como uma redução de 80% ou mais no crescimento, quando comparado com o controle). Se a CIM para trimetoprim-sulfametoxazol for $\leq 0,5/9,5\mu\text{g/mL}$, o meio poderá ser considerado adequado.

7.2 Preparação e Armazenagem de Agentes Antimicrobianos Diluídos

7.2.1 Método de Macrodiluição (Tubo) em Caldo

- (1) Usar tubos de ensaio esterilizados, de 13 x 100mm, para realizar o teste.
- (2) Usar um tubo de controle contendo caldo sem agente antimicrobiano para cada organismo testado.
- (3) Fechar os tubos de ensaio com tampas de rosca ligeiramente soltas, tampas de plástico ou metal, ou tampões de algodão.
- (4) Preparar volumetricamente as diluições 2X (ou outras) finais de antibióticos em caldo. A Tabela 6 apresenta um procedimento conveniente e confiável para preparar as diluições. O volume mínimo final necessário para o teste é de 1mL de cada diluição. Pode-se usar uma única pipeta para medir todos os diluentes e acrescentar, depois, a solução padrão de antimicrobiano ao primeiro tubo de ensaio. Deve-se usar outra pipeta para cada diluição restante naquele conjunto. Visto que haverá uma diluição de 1:2 das drogas quando for acrescentado um volume equivalente de inóculo, as diluições de antimicrobiano são preparadas, com frequência, em concentrações 2X a concentração final desejada.

7.2.2 Método de Microdiluição em Caldo

- (1) Este método é denominado “microdiluição,” porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de plástico estéreis, próprias para microdiluição, que possuem poços de fundo redondo ou cônico. Cada poço deverá conter 0,1mL de caldo. Para preparar as placas de microdiluição, pode-se diluir os agentes antimicrobianos conforme descrito na Seção 7.2.1 ou na Tabela 6.
- (2) A maneira mais conveniente de preparar as placas de microdiluição é usar um dispositivo dispensador com diluições de antimicrobiano em, pelo menos, 10mL de caldo. Essas diluições são usadas para dispensar 0,1mL ($\pm 0,02$) em cada um dos 96 poços da placa padrão. Quando o inóculo é acrescentado usando pipeta, conforme descrito na Seção 7.3.2.2, as soluções de antimicrobiano são preparadas em concentrações 2X da concentração final desejada e os poços preenchidos com 0,05mL, ao invés de 0,1mL. Cada placa deverá incluir um poço de controle de crescimento e um poço negativo (não inoculado).
- (2) As placas cheias devem ser seladas em sacos de plástico e colocadas imediatamente num congelador a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ (de preferência a $\leq -60^{\circ}\text{C}$) até serem utilizadas. Embora os agentes antimicrobianos nas placas congeladas permaneçam estáveis durante vários meses, alguns agentes (ex., ácido clavulânico e imipenem) são mais lábeis do que outros e devem ser armazenados a $\leq -60^{\circ}\text{C}$. As placas não devem ser mantidas em congelador auto-descongelante e as soluções antimicrobianas descongeladas não devem ser congeladas de novo; os ciclos de congelar-descongelar aceleram a degradação de alguns agentes antimicrobianos, especialmente os β -lactâmicos.

^b ATCC[®] é marca registrada da American Type Culture Collection.

7.3 Testes de Diluição em Caldo

7.3.1 Preparação do Inóculo

Pode se preparar um inóculo padrão para testes de macrodiluição ou microdiluição em caldo seja cultivando microorganismos até a fase log (crescimento exponencial), em geral de três a cinco horas, até a turbidez de uma solução padrão de McFarland de 0,5, seja suspendendo as colônias diretamente até alcançar a mesma densidade, conforme descrito na Seção 5.

(1) Em condições ideais, deve-se diluir o inóculo ajustado em caldo (método de macrodiluição), água ou solução salina até 15 minutos após sua preparação, de maneira que, após a inoculação, cada tubo de ensaio ou poço contenha aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. O procedimento de diluição para obter esse inóculo final varia conforme o método de aplicação do inóculo em cada poço ou tubo de ensaio e dependendo do organismo sendo testado, devendo ser calculado para cada situação. No caso dos testes de microdiluição, é indispensável saber o volume exato de inóculo aplicado nos poços para fazer esse cálculo. Por exemplo, se o volume do meio no poço for 0,1mL e o volume de inóculo, 0,005mL, a suspensão McFarland 0,5 (1×10^8 UFC/mL) deverá ser diluída 1:10 para se conseguir uma diluição de 10^7 UFC/mL. Quando 0,005mL dessa suspensão for inoculado no caldo, a concentração final de bactérias do teste será aproximadamente 5×10^5 UFC/mL (ou 5×10^4 UFC/poço, no método de microdiluição).

(2) Para *Haemophilus* spp. e os estreptococos, seguir as instruções específicas apresentadas nas Seções 8.1 e 8.3.

(3) Recomenda-se que os laboratórios realizem periodicamente contagem de colônias nas suspensões de inóculo a fim de verificar se a concentração final de inóculo obtida rotineiramente está bem próxima de 5×10^5 UFC/mL para *E. coli* ATCC® 25922. Isso pode ser conseguido facilmente removendo uma alíquota de 0,01mL do poço ou tubo de ensaio de controle de crescimento imediatamente após a inoculação e diluindo-a em 10mL de solução salina a 0,9% (9 g/L de cloreto de sódio) (diluição 1:1.000). Após misturar, espalha-se uma alíquota de 0,1mL sobre a superfície de um meio ágar apropriado. Após incubação, a presença de aproximadamente 50 colônias indicará uma densidade de inóculo de 5×10^5 UFC/mL.

7.3.2 Inoculação do Caldo em Tubos de Ensaio ou Placas de Microdiluição

7.3.2.1 Método de Macrodiluição (Tubo de Ensaio) em Caldo

Acrescenta-se 1mL de inóculo ajustado a cada tubo contendo 1mL de agente antimicrobiano na série de diluições (e a um tubo de controle positivo contendo apenas caldo) até 15 minutos após a normatização do inóculo, conforme descrito anteriormente, misturando a seguir. Isso resulta numa diluição 1:2 de cada concentração de antimicrobiano e uma diluição 1:2 do inóculo.

Recomenda-se efetuar uma verificação da pureza da suspensão de inóculo por meio de subcultura de uma alíquota numa placa de ágar não-seletivo para incubação simultânea.

7.3.2.2 Método de Microdiluição em Caldo

Até 15 minutos após a normatização do inóculo conforme descrito anteriormente, cada poço da placa de microdiluição pode ser inoculado usando um inoculador que aplique um volume de, no máximo, 10% do volume no poço (ex., $\leq 10\mu\text{L}$ de inóculo em 0,1mL de solução de agente antimicrobiano). Por outra parte, usar uma pipeta de 0,05mL resulta numa diluição 1:2 diluição do conteúdo de cada poço (contendo 0,05mL), como no teste de macrodiluição. Recomenda-se realizar uma verificação da pureza da suspensão de inóculo por meio de subcultura de uma alíquota numa placa de ágar não-seletivo para incubação simultânea.

Para prevenir secagem, cada placa deverá ser selada num saco de plástico, com fita aderente de plástico, ou tampa de plástico bem justa, antes de incubar a placa.

7.3.3 Incubação

Os tubos de macrodiluição, ou as placas de microdiluição, inoculados devem ser incubados a 35° C durante 16-20 horas num incubador em ar ambiente. Para manter a mesma temperatura de incubação para todas as culturas, só deverá haver quatro placas de microdiluição em cada pilha. Nos testes de *Haemophilus* spp. e dos estreptococos, o período de incubação é de 20-24 horas em ar ambiente antes de interpretar os resultados. No caso de estafilococos e enterococos, são necessárias 24 horas completas de incubação com oxacilina e vancomicina (ver as Seções 9.1 e 9.2).

7.3.4 Determinação dos Pontos Finais da CIM

A CIM é a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo nos tubos ou poços de microdiluição conforme detectado a olho nu. Pode-se usar visão auxiliada por aparelhos para facilitar a leitura dos testes de microdiluição e registrar os resultados, contanto que não prejudique a habilidade de perceber crescimento nos poços. A quantidade de crescimento nos poços ou tubos contendo o antibiótico deve ser comparada com a quantidade de crescimento nos poços ou tubos de controle de crescimento (sem antibiótico) usada em cada conjunto de testes ao determinar os pontos finais de crescimento. Para que o teste seja considerado válido, é necessário que haja crescimento (≥ 2 mm turbidez definitiva) no poço de controle positivo. Com trimetoprim e as sulfonamidas, os antagonistas no meio podem permitir um ligeiro crescimento; portanto, deve-se ler o ponto final na concentração em que haja uma redução de 80% ou mais do crescimento, quando comparado com o controle. Quando se pula um único poço em um teste de microdiluição, deve se ler a CIM mais alta. Não se deve relatar os resultados dos testes de drogas das quais mais de um poço foi pulado. Em geral, as CIMs de microdiluição para os bacilos gram-negativos são iguais ou uma diluição 2X mais baixos do que as CIMs de testes de macrodiluição comparáveis.⁸

8 Organismos Fastidiosos

O meio Mueller-Hinton descrito anteriormente para patógenos aeróbios de crescimento rápido não é apropriado para os testes de sensibilidade de organismos fastidiosos. Para fazer testes de CIM com organismos fastidiosos, é indispensável mudar o meio, os procedimentos de controle de qualidade e os critérios de interpretação em função de cada organismo testado. Os testes de diluição para *H. influenzae* (usando Meio *Haemophilus* de Teste), *N. gonorrhoeae* (usando meio base de ágar GC) e os estreptococos (usando caldo Mueller-Hinton de cátion ajustado suplementado com sangue lisado de cavalo) têm se demonstrado confiáveis; esses testes encontram-se descritos nesta Norma. Além disso, a tabela indicada apresenta os meios e aspectos técnicos importantes dos testes dos seguintes organismos: *Bacillus anthracis* (Tabela 2K), *Campylobacter* spp. (Tabela 3A), *Helicobacter pylori* (Tabela 2J), *Listeria* spp. (Tabela 7) e *Neisseria meningitidis* (Tabela 7).

8.1 Espécies *Haemophilus*

Os testes de CIM das espécies *Haemophilus* usando o Meio *Haemophilus* de Teste (HTM) foram desenvolvidos apenas para diluição em caldo, conforme anteriormente descrito. O teste de diluição em ágar usando HTM ainda não foi estudado.

8.1.1 Meio Caldo

O meio preferido para os testes de diluição em caldo de *Haemophilus* spp. é o HTM.⁷ Na forma de caldo, o HTM consiste em:

- Caldo de Mueller-Hinton;
- 15µg/mL de β-NAD;
- 15µg/mL de hematina bovina;
- 5g/L de extrato de levedo; e
- 0,2 IU/mL de timidina fosforilase (nos testes de sulfonamidas ou trimetoprim).

Para fazer HTM, prepara-se inicialmente uma solução padrão fresca de hematina, dissolvendo 50mg de pó de hematina bovina em 100mL de NaOH 0,01 mol/L, aquecendo e mexendo até o pó estar completamente dissolvido. Acrescentam-se 30mL da solução padrão de hematina a 1L de MHB com 5g de extrato de levedo. Após autoclavar e resfriar, os cátions são acrescentados assepticamente, se necessário, como na CAMHB, além de 3mL de uma solução padrão de NAD (50mg de NAD dissolvidos em 10mL de água destilada e esterilizado por filtração), também acrescentados de maneira asséptica. Se os testes forem com sulfonamidas ou trimetoprim, deve-se acrescentar também 0,2 IU de timidina fosforilase ao meio asséptico. O pH deverá ser de 7,2 a 7,4.

8.1.2 Metodologia do Teste

(1) Deve-se usar o procedimento de suspensão direta de colônias para os testes de *Haemophilus* spp. Usando colônias retiradas diretamente de uma placa de cultura incubada durante a noite (de preferência, 20-24 horas), prepara-se uma suspensão do organismo do teste em caldo Mueller-Hinton ou solução salina a 0,9%. A suspensão deverá ser ajustada para uma turbidez equivalente à solução padrão McFarland 0,5, usando um fotômetro. Essa suspensão deverá conter aproximadamente de 1 a 4 x 10⁸ UFC/mL. É preciso cuidado ao preparar a suspensão, porque as concentrações mais altas de inóculo podem levar a resultados falsos-resistentes com alguns agentes antimicrobianos β-lactâmicos, em especial quando se testa cepas de *H. influenzae* produtoras de β-lactamase. A concentração precisa dos organismos na suspensão inicial dependerá das condições de incubação na cultura em ágar chocolate durante a noite; em especial, no período de incubação. Por exemplo, uma suspensão de *H. influenzae* em McFarland 0,5 preparada a partir de uma cultura em ágar chocolate incubada durante 16-18 horas deverá conter aproximadamente de 3 a 4 x 10⁸ UFC/mL; enquanto que uma suspensão preparada a partir de uma cultura em ágar chocolate incubada durante 24 horas apresentará menos células viáveis, ex., aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL. Com *Haemophilus* spp., inóculos apreciavelmente mais concentrados do que 5 x 10⁵ UFC/mL podem levar a CIMs incorretamente altas com certas cefalosporinas, em especial com as cepas produtoras de β-lactamase. A suspensão de inóculo deve ser usada para a inoculação das placas até 15 minutos após ajustar sua turbidez.

(2) A metodologia do teste de diluição em caldo deve ser obedecida conforme descrito começando na Seção 7.3.2.

(3) As placas devem ser incubadas em ar ambiente, a 35° C, durante 20-24 horas, antes de fazer a leitura das CIMs.

8.1.3 Critérios de Interpretação da CIM

A Tabela 1A apresenta os agentes antimicrobianos sugeridos para testes rotineiros de *Haemophilus* spp, sendo que a Tabela 2E relaciona os critérios de interpretação da CIM a serem usados nos testes de *Haemophilus* spp.

8.2 *Neisseria gonorrhoeae*

Os únicos testes de CIM para *N. gonorrhoeae* desenvolvidos são os de diluição em ágar usando base de ágar GC e suplemento de crescimento definido a 1%, conforme descrito a seguir.

8.2.1 Meio ágar

O meio recomendado para os testes de *N. gonorrhoeae* é ágar GC, ao qual se acrescenta um suplemento de crescimento definido a 1% (1,1g de L-cisteína; 0,03g de guanina ácido clorídrico (HCL); 3mg de tiamina HCL; 13mg de PABA; 0,01g de B12; 0,1g de cocarboxilase; 0,25g de NAD; 1,0g de adenina; 10g de L-glutamina; 100g de glicose; 0,02g de nitrato férrico [em 1 L de H₂O]) após autoclavar. É necessário usar um suplemento isento de cisteína para testes com carbapenems e clavulanato. Os suplementos de crescimento definido que contêm cisteína *não* alteram significativamente os testes de diluição com outras drogas.

8.2.2 Metodologia do Teste

(1) Deve-se usar a metodologia de suspensão direta de colônias nos testes de *N. gonorrhoeae*. Usando colônias retiradas diretamente de uma placa de cultura em ágar chocolate incubado durante a noite, prepara-se uma suspensão equivalente à solução padrão McFarland 0,5 seja em caldo Mueller-Hinton ou em solução salina a 0,9%. A suspensão de inóculo deverá ser usada para inocular as placas até 15 minutos após ajustar sua turbidez.

(2) Deve se seguir os passos da metodologia do teste de diluição em ágar descritos na Seção 6 para bactérias não-fastidiosas.

(3) As placas são incubadas em atmosfera com CO₂ a 5%, a 35° C, durante 20-24 horas, antes de efetuar a leitura das CIMs.

8.2.3 Critérios de Interpretação da CIM

A Tabela 1A apresenta os agentes antimicrobianos sugeridos para testes rotineiros de *N. gonorrhoeae*, enquanto que a Tabela 2F relaciona os critérios específicos de interpretação da CIM a serem usados nos testes de *N. gonorrhoeae*.

8.3 *Streptococcus pneumoniae* e Outros *Streptococcus* spp.

Os únicos testes de CIM desenvolvidos para as espécies de *Streptococcus* usando caldo Mueller-Hinton com cátion ajustado, acrescidos de 2-5% de sangue lisado de cavalo, são os de diluição em caldo, conforme descrito a seguir. O método de diluição em ágar ainda não foi estudado.

8.3.1 Meio Caldo

O meio recomendado para os testes de *S. pneumoniae* e outros estreptococos é o caldo Mueller-Hinton com cátion ajustado, suplementado com 2-5% de sangue lisado de cavalo. O método de preparação do sangue lisado de cavalo e os detalhes de sua incorporação ao meio para os testes são apresentados na Seção 7.1.

8.3.2 Metodologia do Teste

(1) Deve-se usar o procedimento de suspensão direta de colônias nos testes de *S. pneumoniae*. Usando colônias retiradas diretamente de uma placa de cultura em ágar sangue de carneiro incubada durante a noite (18-20 horas), prepara-se uma suspensão equivalente à solução padrão McFarland 0,5 seja em caldo Mueller-Hinton, seja em solução salina a 0,9%. A suspensão de inóculo deve ser usada para inocular as placas até 15 minutos após ajustar sua turbidez.

(2) Deve se seguir os passos da metodologia dos testes de diluição em caldo descritos no começo da Seção 7.3.2 para bactérias não-fastidiosas.

(3) As placas devem ser incubadas em ar ambiente, a 35° C, durante 20-24 horas, antes de efetuar a leitura das CIMs.

8.3.3 Critérios de Interpretação da CIM

A Tabela 1A apresenta os agentes antimicrobianos sugeridos para testes rotineiros de pneumococos e outros estreptococos, enquanto que as Tabelas 2G e 2H, respectivamente, indicam os critérios específicos de interpretação das CIMs a serem usados nos testes de *S. pneumoniae* e outros estreptococos.

9 Organismos-Problema

9.1 Estafilococos

9.1.1 Resistência a Meticilina/Oxacilina

Historicamente, a resistência às penicilinas β -lactamase-estáveis anti-estafilococos tem sido denominadas de “meticilina-resistentes,” que é a razão das siglas “MRSA”, em inglês (*methicillin-resistant S. aureus*), ou “MRS” (*methicillin-resistant staphylococci*), que ainda são usadas de maneira generalizada, embora a meticilina não seja mais o agente de escolha para testes ou tratamento. Nesta Norma, a resistência a esses agentes é denominada usando vários termos, ex., “MRS,” “meticilina-resistente,” ou “oxacilina-resistente.”

Alguns laboratórios ainda têm problemas para detectar a MRS. Para melhor identificar essas cepas é necessário considerar os seguintes pontos.

- Os testes que incorporam oxacilina têm maior probabilidade de detectar resistência do que os de meticilina ou nafcilina. Portanto, a oxacilina é o agente de preferência para testes de resistência a meticilina/oxacilina.
- Recomenda-se acrescentar NaCl (2% p/v; 0,34 mol/L) ao meio, para diluição tanto em ágar como em caldo, nos testes com meticilina, nafcilina e oxacilina.
- O inóculo deve ser preparado usando o método de suspensão direta de colônias (Seção 5.3), ao invés do método de crescimento do inóculo (Seção 5.2).
- Os testes para detecção de MRS devem ser incubados durante 24 horas completas (ao invés de 16 a 20 horas), a 33-35° C (não exceder os 35° C), antes de se relatar sensibilidade. A resistência pode ser relatada sempre que se observar crescimento após incubação durante, pelo menos, 16 horas.
- Os microbiologistas devem lembrar de que os estafilococos resistentes a meticilina são, com frequência, resistentes a múltiplas classes de agentes antimicrobianos, incluindo os aminoglicosídeos, clindamicina, macrolídeos, fenicóis, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina. A observação de resistência múltipla deverá indicar a possibilidade de resistência a meticilina. Entretanto, há registros de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina, mas que não apresentam resistência a outras classes de agentes antimicrobianos, isoladas em populações de pacientes ambulatoriais e hospitalizados.
- Se houver dúvidas quanto ao resultado de um teste de CIM com um *S. aureus* possivelmente resistente a meticilina, será necessário realizar testes confirmatórios adicionais, como o teste de triagem em ágar com sal de oxacilina descrito a seguir e na Tabela 2C.

- *S. aureus* metilicilina-resistente e os estafilococos coagulase-negativos devem ser relatados como resistentes a todos os cefens e outros β -lactâmicos, como amoxicilina-ácido clavulânico, ampicilina-sulbactam, ticarcilina-ácido clavulânico, piperacilina-tazobactam e imipenem, independentemente dos resultados dos testes *in vitro* com esses agentes. Isso porque a maioria dos casos documentados de infecções MRS respondeu mal a terapia com β -lactâmico, ou porque ainda não foram apresentados dados clínicos convincentes documentando a eficácia clínica desses agentes.
- Quaisquer isolados de estafilococos que apresentem o gene *mecA*, ou produzam PBP2a, o produto do gene *mecA*, devem ser relatados como resistentes a oxacilina.

9.1.2 Placas de Triagem de Oxacilina

O teste de triagem de oxacilina usando placas de ágar NaCl pode ser realizado em acréscimo aos métodos de diluição antes descritos para a detecção de MRSA. O teste é executado inoculando um isolado de *S. aureus* em ágar Mueller-Hinton suplementado com NaCl (4% p/v; 0,68mol/L) e contendo 6 μ g de oxacilina/mL. O ágar é inoculado com uma suspensão direta de colônias equivalente à solução padrão de McFarland 0,5, por meio de uma alça ou um *swab* de 1 μ L. Usando uma alça de 1 μ L, espalhe o inóculo numa área com 10-15mm de diâmetro. Alternativamente, pode-se usar um *swab*, pressionando, como no teste de disco difusão, e depois salpicando uma área de, pelo menos, 10-15mm de diâmetro ou riscando todo um quadrante. A placa deverá ser incubada em temperatura de até 35° C, no máximo, durante 24 horas e examinada usando luz transmitida para verificar a presença de pequenas colônias (>1 colônia) ou um tênue filme de crescimento, que indica a presença de resistência a oxacilina (ver a Tabela 2C).⁹ As placas não devem ser usadas novamente após incubadas.

9.1.3 Sensibilidade Reduzida a Vancomicina e Resistência a Vancomicina

A literatura descreve cepas de estafilococos coagulase-negativas e resistentes às CIMs de vancomicina e teicoplanin.^{10,11} A primeira ocorrência de cepas de *S. aureus* com sensibilidade diminuída a vancomicina (CIMs de 4 a 8 μ g/mL) foi relatada no Japão em 1997,¹² seguida de relatórios nos Estados Unidos e na França.¹³ O mecanismo exato de resistência que resulta nessas CIMs elevadas é desconhecido, embora é provável que implique alterações na parede celular e hiperexpressão das proteínas ligadoras da penicilina (PBPs). Até a data, todas essas cepas de *S. aureus* parecem ter desenvolvido MRSA.

Para identificar cepas com CIMs de vancomicina na faixa de 4 a 8 μ g/mL, é necessário realizar testes de CIM. O teste de triagem de vancomicina usando ágar descrito para os enterococos pode detectar esses isolados,¹⁴ incubando as placas durante 24 horas completas, a 35° C, embora deva ser confirmado pela CIM. O uso de uma cepa de controle de qualidade sensível, como *S. aureus* ATCC[®] 29213, é importância crítica para assegurar a especificidade. Enquanto não se dispões de dados sobre a prevalência e significância clínica desses isolados, os laboratórios devem examinar as cepas MRSA mais cuidadosamente, visando a detectar CIMs elevadas para vancomicina.

Duas cepas de *S. aureus* com CIMs de 1024 μ g/mL e 32 μ g/mL foram relatadas em julho e outubro de 2002. Ambas as cepas continham um gene *vanA* similar ao encontrado nos enterococos.^{15,16}

9.2 Enterococos

9.2.1 Resistência a Penicilina/Ampicilina

Os enterococos podem ser resistentes a penicilina e ampicilina devido à produção de proteínas ligadoras de penicilina de baixa afinidade (PBPs) ou, mais raramente, devido à produção de β -lactamase. O teste de diluição em ágar ou caldo pode detectar, com precisão, isolados com PBPs alterados, mas não é confiável para detectar as cepas produtoras de β -lactamase. A melhor maneira de detectar essas cepas mais raras

produtoras de β -lactamase é usando um teste direto de β -lactamase baseado em nitrocefim (ver a Seção 10). O teste de β -lactamase positivo prediz a resistência à penicilina, assim como as amino-, carboxi- e ureidopenicilinas. Certos enterococos resistentes a penicilina ou ampicilina podem apresentar um alto grau de resistência (ex, CIMs ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$ de penicilina). Os enterococos com menores graus de resistência (penicilina ≤ 64 $\mu\text{g/mL}$ ou ampicilina ≤ 32 $\mu\text{g/mL}$) podem ser sensíveis à ação sinérgica dessas penicilinas em combinação com gentamicina ou estreptomicina (na ausência de alto grau de resistência) se forem usadas doses altas de penicilina, enquanto que as cepas com altos níveis de resistência (penicilina > 64 $\mu\text{g/mL}$ ou ampicilina > 32 $\mu\text{g/mL}$) podem não ser sensíveis ao efeito sinérgico.^{17,18} Deve se considerar os pedidos dos médicos de determinar a verdadeira CIM de penicilina ou ampicilina para isolados de enterococos de sangue ou LCR.

9.2.2 Resistência a Vancomicina

A identificação acurada dos enterococos resistentes à vancomicina mediante o teste de diluição em ágar ou caldo requer incubação durante 24 horas completas (ao invés de 16 a 20 horas) antes de liberar resultados de sensível, além de um exame cuidadoso das placas, tubos de ensaio, ou poços para detectar evidência de crescimento fraco. Também é possível usar o teste de triagem de vancomicina em ágar, conforme descrito a seguir e na Tabela 2D.

9.2.3 Placas de Triagem de Vancomicina

O teste de triagem de vancomicina usando placas de ágar pode ser usado em acréscimo aos métodos de diluição descritos anteriormente para a detecção de enterococos resistentes a vancomicina. O teste é realizado inoculando um isolado de enterococo em ágar BHI suplementado com 6 μg de vancomicina/mL.¹⁹ O ágar é inoculado com uma suspensão direta de colônias equivalente à solução padrão de McFarland 0,5, por meio de uma alça ou um *swab* de 1 ou 10 μL .²⁰ Usando uma alça, espalhe o inóculo numa área com 10-15mm de diâmetro. Alternativamente, pode-se usar um *swab*, pressionando, como no teste de disco difusão, e depois salpicando uma área de, pelo menos, 10-15mm de diâmetro. A placa deverá ser incubada a 35° C, durante 24 horas, e examinada cuidadosamente para verificar a presença de pequenas colônias (> 1 colônia) ou um tênue filme de crescimento, que indica a presença de resistência a vancomicina (ver a Tabela 2D).

9.2.4 Alto Nível de Resistência aos Aminoglicosídeos

Um alto nível de resistência aos aminoglicosídeos indica que um isolado de enterococos não será afetado sinergeticamente por uma combinação de penicilina ou glicopeptídeo + um aminoglicosídeo.¹⁷ Pode-se usar teste de ágar ou caldo com alta concentração de gentamicina (500 $\mu\text{g/mL}$) e estreptomicina (1.000 $\mu\text{g/mL}$ com microdiluição em caldo; 2.000 $\mu\text{g/mL}$ com ágar) para fazer a triagem deste tipo de resistência (ver a Tabela 2D). A Tabela 2D também apresenta o controle de qualidade para esses testes. Não é necessário testar outros aminoglicosídeos, uma vez que sua atividade contra os enterococos não é superior à da gentamicina ou estreptomicina.

9.3 Bacilos Gram-negativos Produtores de β -Lactamase de Espectro Ampliado

As β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs) são enzimas resultantes da mutação do gene da β -lactamase comum mediada por plasmídeo, como TEM-1, TEM-2 e SHV-1. As ESBLs podem conferir resistência às penicilinas, cefalosporinas e ao aztreonam em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* e alguns outros gêneros da família Enterobacteriaceae que, em geral, são sensíveis a esses agentes.²¹ Algumas dessas cepas apresentarão CIMs acima das da população sensível normal, embora abaixo dos pontos de corte padrão para aztreonam e certas cefalosporinas de espectro ampliado. Pode se fazer a triagem dessas cepas para potencial produção de ESBL usando os pontos de corte para triagem relacionados no quadro no fim da Tabela 2A. Outras cepas podem ser classificadas

como resistentes ou de resistência intermediária usando os pontos de corte padrão para um ou mais desses agentes. Em todas as cepas que expressam as ESBLs, as CIMs de uma ou mais cefalosporinas de espectro ampliado ou aztreonam deverão diminuir na presença de ácido clavulânico (ver o quadro de ESBL no fim da Tabela 2A). Para todas as cepas produtoras de ESBL, a interpretação dos resultados dos testes deve ser relatada como resistente a todas as penicilinas, cefalosporinas e ao aztreonam. As atuais recomendações de testes e relatórios adicionais são apresentadas nas Tabelas 1 e 2A.

10 Testes de β -Lactamase

10.1 Propósito

Um teste rápido de β -lactamase pode fornecer mais informações clinicamente relevantes, mais precocemente, do que o resultado de um teste de CIM com *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* e *Moraxella catarrhalis*; é o único teste confiável para a detecção de *Enterococcus* spp produtores de β -lactamase. Além disso, os testes de β -lactamase podem esclarecer os resultados dos testes de sensibilidade dos estafilococos à penicilina, determinada por microdiluição em caldo, especialmente nas cepas com CIMs limítrofes (0.06 to 0.25 $\mu\text{g/mL}$).

O resultado positivo de teste de β -lactamase prediz o seguinte:

- resistência a penicilina, ampicilina e amoxicilina nas *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* e *M. catarrhalis*; e
- resistência a penicilina, assim como às amino-, carboxy- e ureidopenicilinas em estafilococos e enterococos.

Um resultado negativo do teste de β -lactamase não elimina a possibilidade de resistência devida a outros mecanismos. Não se deve testar os membros da família Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. e outros bacilos gram-negativos aeróbios, porque os resultados podem não predizer a sensibilidade aos β -lactâmicos mais freqüentemente usados na terapia.

10.2 Seleção de um Teste de β -Lactamase

O método de preferência para testar *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *M. catarrhalis*, estafilococos e enterococos²² é o teste baseado em nitrocefim. Os testes de β -lactamase acidimétricos têm produzido, em geral, resultados aceitáveis com *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* e os estafilococos. Os testes iodométricos podem ser usados para *N. gonorrhoeae*, mas apenas os testes baseados em nitrocefim devem ser usados para testar *M. catarrhalis*.²³ A detecção acurada da β -lactamase em estafilococos pode exigir a indução da enzima e incubação de um teste baseado em nitrocefim durante até uma hora. A indução pode ser realizada com facilidade testando o crescimento a partir da margem do halo em volta de um teste de disco de oxacilina. É necessário ser cauteloso ao efetuar esses ensaios, de maneira a assegurar resultados acurados, incluindo testes de cepas de controle positivas e negativas quando os isolados clínicos são examinados.

11 Relatórios dos Resultados de CIM

Os valores de CIM determinados conforme descrito nesta Norma podem ser relatados diretamente aos clínicos visando a auxiliar na determinação da terapia apropriada. Entretanto, para que todos os clínicos entendam os dados, é essencial que as diferentes categorias de resultado sejam informadas de maneira rotineira. As categorias interpretativas recomendadas para os diversos valores de CIM estão incluídas nas tabelas relativas a cada grupo de organismos e baseiam-se nos dados de avaliação descritos na Norma M23—*Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria e Quality Control Parameters* do NCCLS.

Para a maioria dos agentes, essas categorias foram desenvolvidas mediante determinação das CIMs de um grande número de isolados, incluindo aqueles com mecanismos conhecidos relevantes de resistência a uma determinada classe de drogas. Em segundo lugar, as CIMs foram analisadas em relação à farmacocinética da droga em esquemas de dosagem normal. Terceiro, sempre que possível, os critérios interpretativos tentativos dos testes *in vitro* foram analisados em relação a estudos de eficácia clínica no tratamento de patógenos específicos, conforme delineado na Norma M23— *Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria e Quality Control Parameters* do NCCLS.

11.1 Sensível

A categoria “sensível” significa que uma infecção por uma determinada cepa pode ser tratada adequadamente com a dose de agente antimicrobiano recomendada para esse tipo de infecção e espécie infectante, exceto quando contra-indicado.

11.2 Intermediária

A categoria “intermediária” inclui isolados com CIMs do agente antimicrobiano que se aproximam de níveis sanguíneos e tissulares atingíveis e para os quais as taxas de resposta podem ser mais baixas do que nos isolados sensíveis. A categoria “intermediária” implica eficácia clínica nos sítios corpóreos de concentração fisiológica das drogas (ex., quinolonas e β -lactâmicos na urina) ou possibilidade de se usar uma dose da droga maior do que a normal (ex., β -lactâmicos). Essa categoria também inclui uma zona-tampão, o que deverá impedir que pequenos fatores técnicos não sujeitos a controle causem discrepâncias importantes na interpretação, especialmente no caso de drogas com margens estreitas de farmacotoxicidade.

11.3 Resistente

As cepas “resistentes” não são inibidas pelas concentrações sistêmicas dos agentes antimicrobianos geralmente atingíveis nos regimes terapêuticos normais; e/ou podem ter CIMs dentro da faixa de maior probabilidade de ocorrência de mecanismos específicos de resistência microbiana (ex., β -lactamases), além de sua eficácia clínica não ter sido confiável em regimes terapêuticos.

12 Testes de Controle de Qualidade

12.1 Propósito

As metas do programa de controle de qualidade são auxiliar no monitoramento dos seguintes itens:

- a precisão (reprodutibilidade) e acurácia dos testes de sensibilidade;
- o desempenho dos reagentes usados nos testes; e
- o desempenho das pessoas que realizam os testes e fazem a leitura dos resultados.

Embora outros fatores também intervenham, a melhor maneira de alcançar essas metas está nos testes de cepas de controle de qualidade com estabilidade genética conhecida aos agentes antimicrobianos a serem testados.

12.2 Responsabilidades do Controle de Qualidade

Os laboratórios modernos dependem muito dos fabricantes de produtos farmacêuticos e de diagnóstico que fornecem reagentes, meios, ou sistemas para realizar testes de sensibilidade antimicrobiana. Embora esta seção vise à aplicação dos métodos de referência padrão, pode ser aplicada a certos sistemas disponíveis no mercado que se baseiam, principalmente ou em parte, nesses métodos.

Uma divisão lógica das responsabilidades pode ser descrita da seguinte maneira.

- Fabricantes (Produtos Comerciais ou “Internos”):
 - estabilidade do antimicrobiano;
 - identificação do antimicrobiano;
 - potência das soluções padrão de antimicrobianos;
 - adesão aos Regulamentos do Sistema de Qualidade do U.S. FDA;
 - integridade do produto; e
 - responsabilidade e rastreabilidade a um consignatário.
- Laboratório (Usuário):
 - armazenamento nas condições ambientais recomendadas pelo fabricante (para evitar a deterioração da droga);
 - proficiência dos técnicos de laboratório; e
 - adesão à metodologia estabelecida, ex., preparação do inóculo, condições de incubação, interpretação dos pontos finais.

Os fabricantes de produtos comerciais devem desenhar e recomendar um programa de controle de qualidade que permita que o usuário avalie as variáveis (ex., densidade do inóculo, condições de armazenamento/transporte) que mais tendem a causar problemas de desempenho laboratorial e determine se o ensaio tem desempenho correto quando executado de acordo com as instruções de uso.

12.3 Cepas de Controle de Qualidade de Referência

- As cepas de referência ideais para o controle de qualidade dos métodos de diluição têm CIMs próximas ao meio da faixa da concentração, para todos os agentes antifúngicos testados, ex., uma cepa de controle ideal é inibida na quarta diluição de uma série de sete diluições, mas as cepas com CIMs entre a terceira ou a quinta diluição também são aceitáveis. Em certas circunstâncias, no caso dos agentes antimicrobianos mais novos e potentes, poderá ser necessário testar cepas adicionais de controle de qualidade, que não são testadas normalmente, a fim de fornecer valores em escala.
- Nos testes de três ou menos diluições 2X adjacentes de um agente antimicrobiano usando esses métodos, é necessário modificar a metodologia do controle de qualidade. Uma alternativa possível é usar um organismo de controle com um valor modal de CIM igual, ou não inferior, a uma diluição 2X da concentração mais baixa e um segundo organismo de controle com uma CIM modal igual, e não superior, a uma diluição 2X da concentração mais alta. A combinação dos resultados derivados dos testes dessas duas cepas deverá fornecer, pelo menos, um ponto final em escala. Para os usuários de sistemas comerciais, o melhor uso dessa estratégia pode ser testar, seletivamente, os agentes mais lábeis incluídos nos painéis, e.g., combinações de ácido clavulânico, meticilina, imipenem e cefaclor.

As cepas de controle de qualidade usadas nos testes padrão de disco difusão também têm sido usadas, com frequência, como cepas de controle para os testes de sensibilidade por diluição. A cepa

Staphylococcus aureus ATCC[®] 25923, entretanto, não possui grande utilidade nos testes de diluição, devido a sua extrema sensibilidade à maioria das drogas. O *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213 é uma cepa fraca produtora de β -lactamase, útil como cepa de controle para os testes de diluição. A cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®] 27853 desenvolve resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos após transferências repetidas aos meios de laboratório, embora esse problema possa ser minimizado retirando uma nova cultura de armazenagem a intervalos apropriados, ou sempre que a cepa começar a se mostrar resistente. Embora não exista um conjunto perfeito de cepas de controle de qualidade, as cepas relacionadas a seguir e nas Tabelas 3 e 3A deverão atender às necessidades da maioria dos laboratórios quando realizam testes de referência padrão por diluição.

As seguintes cepas de referência são recomendadas para controle dos testes de diluição:

- *Enterococcus faecalis* ATCC[®] 29212;
- *Enterococcus faecalis* ATCC[®] 51299;
- *Escherichia coli* ATCC[®] 25922;
- *Escherichia coli* ATCC[®] 35218;
- *Haemophilus influenzae* ATCC[®] 49247;
- *Haemophilus influenzae* ATCC[®] 49766;
- *Helicobacter pylori* ATCC[®] 43504;
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC[®] 700603;
- *Neisseria gonorrhoeae* ATCC[®] 49226;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®] 27853;
- *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213;
- *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 43300; e
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC[®] 49619.

Enterococcus faecalis ATCC[®] 51299 e *Enterococcus faecalis* ATCC[®] 29212 são usadas como organismos de controle para os testes de triagem de vancomicina e aminoglicosídeos de alto nível (Tabela 2D).

Escherichia coli ATCC[®] 35218 é recomendada apenas como organismo de controle para combinações de inibidores de β -lactamase, como aquelas que contêm ácido clavulânico, sulbactam, ou tazobactam.

Haemophilus influenzae ATCC[®] 49247 é um organismo β -lactamase-negativo resistente à ampicilina.

Haemophilus influenzae ATCC[®] 49766 é um organismo sensível à ampicilina, mais reprodutível do que a cepa *H. influenzae* ATCC[®] 49247 no controle de β -lactâmicos selecionados.

Klebsiella pneumoniae ATCC[®] 700603 é usada como controle para os testes de ESBL (Tabela 2A).

Staphylococcus aureus ATCC® 43300 e *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 são usados como organismos de controle para os testes de triagem com sais de oxacilina (Tabela 2C).

12.4 Armazenamento das Cepas de Controle de Qualidade

As cepas de controle de qualidade devem ser testadas usando os métodos de diluição padrão descritos nesta Norma, usando os mesmos materiais e métodos usados nos testes de isolados clínicos.

No caso de armazenamento prolongado, essas culturas de referência devem ser mantidas a temperatura de -20° C, ou menos, (de preferência a -60° C ou menos, ou em nitrogênio líquido) num estabilizador adequado (ex., soro bovino fetal em caldo a 50%, glicerol em caldo de soja tríptica a 10-15%, sangue de carneiro desfibrinado, ou leite desnatado), ou dessecadas-congeladas, sem risco significativo de alteração de sua sensibilidade antimicrobiana.

As culturas de controle em manipulação devem ser armazenadas em ágar de soja tríptica (cepas não fastidiosas) ou em ágar chocolate enriquecido (cepas fastidiosas), a temperatura de 2 a 8° C, fazendo-se uma subcultura toda semana durante, no máximo, três semanas consecutivas. Novas culturas para manipulação devem ser preparadas pelo menos mensalmente, a partir de culturas congeladas, dessecadas-congeladas, ou comerciais.

Antes do teste, deve-se fazer subculturas das cepas em placas de ágar, a fim de se obter colônias isoladas. As culturas congeladas ou dessecadas-congeladas devem passar por duas subculturas antes do teste.

As colônias são cultivadas ou suspensas para os testes de acordo com as técnicas recomendadas de preparação de inóculos.

Pode-se usar uma cultura de controle de qualidade para monitorar a precisão (reprodutibilidade) e acurácia do teste de diluição, contanto que não haja qualquer mudança significativa nas CIMs que não possa ser atribuída a falha metodológica. Se um resultado inexplicável sugerir uma mudança na sensibilidade inerente do organismo, será necessário obter uma cultura fresca da cepa de controle.

Atenção especial à manutenção do organismo (ex., subculturas mínimas) e a seu armazenamento (ex., -60 °C, ou menos) são particularmente importantes para as cepas de controle de qualidade *E. coli* ATCC 35218 e *K. pneumoniae* ATCC 700603, visto que tem sido documentada perda espontânea do plasmídeo que codifica a β-lactamase. Isso pode levar a resultados de controle de qualidade além dos limites aceitáveis.

12.5 Controle de Qualidade de Lotes

(1) Cada novo lote de tubos e placas de microdiluição, assim como placas de ágar para testes de diluição, deve ser testado com cepas de referência apropriadas, a fim de determinar se as CIMs obtidas com o lote estão dentro da faixa de resultados esperados (ver as Tabelas 3 e 3A); caso contrário, o lote deve ser rejeitado.

(2) Pelo menos um tubo, uma placa ou uma placa de ágar, não inoculado, de cada lote deverá ser incubado durante a noite para verificar a esterilidade do meio.

(3) Pode ser necessário testar lotes novos de caldo Mueller-Hinton usados para preparar tubos ou placas de macrodiluição para verificar se têm um conteúdo aceitável de cátions. No caso do caldo Mueller-Hinton, será necessário determinar a CIM de gentamicina para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 e compará-la com a faixa esperada (Tabela 3). Se a CIM for baixa, o caldo pode precisar de suplemento de cátions, conforme indicado na Seção 7.1. Nos testes de daptomicina, os níveis de cátions de cálcio no caldo devem ser de 50 mg/L. O ágar Mueller-Hinton também pode ser testado para verificar se o teor de

cálcio é apropriado. Isso é feito mediante teste de disco difusão com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, usando um disco de 10µg de gentamicina, e com *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, usando um disco de 30µg de daptomicina, conforme descrito na Norma M2—*Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests* do NCCLS. Para ser aceitável, o diâmetro do halo de inibição deverá estar dentro da faixa de controle especificada para gentamicina ou daptomicina, conforme definido na versão mais recente do suplemento M100 à Norma M2.

(4) É indispensável manter registros dos números dos lotes de todos os materiais e reagentes usados nos testes de sensibilidade.

(5) O *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211 pode ser útil como cepa adicional de controle de qualidade para verificar as propriedades de promoção de crescimento do HTM. Em especial, incentiva-se os fabricantes de HTM a usar *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211 como cepa de controle de qualidade.

12.6 Limites de Controle de Qualidade da CIM

Os limites aceitáveis de controle de qualidade da CIM para um único teste de controle de qualidade (combinação droga única/organismo único) são apresentados nas Tabelas 3 e 3A. O desempenho geral do sistema de testes deve ser monitorado usando esses limites, por meio de testes de cepas apropriadas de controle, todo dia que o teste é realizado ou, se se documentar desempenho satisfatório (ver a Seção 12.7.2.1), os testes podem ser realizados toda semana (ver o próximo item).

12.7 Frequência dos Testes de Controle de Qualidade (ver também o Apêndice A)

A opção de realizar testes semanais de controle de qualidade aplica-se apenas a testes rotineiros de CIM. Os testes de controle de qualidade devem ser realizados diariamente no caso de testes de CIM realizados infreqüentemente.

12.7.1 Testes Diários

Quando os testes de controle de qualidade são efetuados todo dia, para cada combinação agente antimicrobiano/organismo, 1 dentre cada 20 resultados consecutivos poderá estar fora da faixa aceitável (com base em limites de confiança de 95%). Qualquer resultado que exceda o limite de 1 dentre 20 testes consecutivos exigirá ação corretiva (ver Seção 12,9).

12.7.2 Testes Semanais

12.7.2.1 Demonstrando Desempenho Satisfatório para Conversão da Frequência dos Testes de Controle de Qualidade, passando de Diários para Semanais

- Testar todas as cepas de controle pertinentes durante 20 a 30 dias consecutivos de teste e documentar os resultados.
- Para mudar a freqüência dos testes de controle de qualidade de diários para semanais, no máximo 1 dentre 20, ou 3 dentre 30, CIMs, para cada combinação agente antimicrobiano/organismo, poderá estar fora dos limites aceitáveis de CIM que constam das tabelas 3 e 3A.

12.7.2.2 Implementando Testes de Controle de Qualidade Semanais

- Os testes de controle de qualidade podem ser realizados semanalmente após ter documentado desempenho satisfatório (ver a Seção 12.7.2.1)

- ◆ Realize testes de controle de qualidade uma vez por semana e sempre que qualquer reagente do teste (ex., um novo lote de caldo do mesmo fabricante) for mudado.
- ◆ Sempre que algum resultado dos testes semanais de controle de qualidade estiver fora da faixa aceitável, é indispensável implementar ação corretiva (ver a Seção 12.9).
 - Se um novo agente antimicrobiano for acrescentado ou o caldo de um fabricante diferente for usado, o mesmo deve ser testado e documentado durante 20 ou 30 dias consecutivos de desempenho satisfatório, antes de passar para uma frequência semanal de testes de controle de qualidade. Além disso, 20 ou 30 dias de testes serão necessários sempre que houver uma mudança importante no método de leitura dos resultados dos testes, como a conversão de leitura visual das CIMs para leitura instrumental, ou uma mudança no tipo de painel usado (ex., mudança de pontos de corte para painéis de CIM).
 - Essas diretrizes também podem ser usadas nos sistemas de testes em que a CIM é determinada usando três, ou menos, diluições 2X adjacentes de um agente antimicrobiano.
 - Para algumas drogas, os registros de controle de qualidade podem indicar a necessidade de testar com mais frequência do que uma vez por semana, devido à rápida degradação da droga (ver as Seções 6.2.1 e 7.2.2).

12.8 Frequência dos Testes de Controle de Qualidade para os Testes de Triagem

A frequência dos testes de controle de qualidade de triagem é a seguinte.

- O controle de qualidade das placas de triagem da vancomicina e dos aminoglicosídeo de alto nível pode ser realizado semanalmente, contanto que esses testes sejam efetuados rotineiramente (ex., uma vez por semana, pelo menos) pelo laboratório e os critérios de mudança da frequência dos testes de controle de qualidade de diário para semanal tenham sido atendidos.
- Pode ser necessária a realização de testes de controle de qualidade de triagem todo dia que o teste é realizado, se o teste não for executado rotineiramente (uma vez por semana, pelo menos) ou se o agente antimicrobiano for lábil (ex., teste de triagem de oxacilina ágar para *S. aureus*).

12.9 Ação Corretiva

12.9.1 Resultado em Desacordo com o Controle Devido a Erro Evidente

Se existir uma razão evidente para o resultado fora dos padrões, incluindo:

- uso da cepa de controle errada;
- contaminação evidente da cepa ou o meio; ou
- uso inadvertido de condições ou temperatura de incubação erradas,

documente a razão do erro e teste novamente a cepa no dia em que o erro for observado. Se os resultados da retestagem estiverem dentro dos limites, não será necessário tomar qualquer outra medida corretiva.

12.9.2 Resultado em Desacordo com o Controle Não Devido a Erro Evidente

12.9.2.1 Ação Corretiva Imediata

- Se não existir uma razão evidente para o resultado fora dos padrões, deverão ser tomadas medidas corretivas imediatas.
- Teste a combinação agente antimicrobiano/organismo em questão no dia em que o erro for observado e acompanhe os testes durante cinco dias consecutivos. Documente todos os resultados.
- Se as cinco CIMs para a combinação agente antimicrobiano/organismo estiverem dentro das faixas aceitáveis, conforme definido nas tabelas 3 e 3A, não será necessário executar ação corretiva adicional.
- Se quaisquer das cinco mensurações de diâmetro do halo estiver fora da faixa aceitável, serão necessárias medidas corretivas (ver a Seção 12.9.2.2).
- Será necessário continuar a realizar testes diários de controle de qualidade até solucionar o problema.

12.9.2.2 Ação Corretiva Adicional

Quando a ação corretiva imediata não resolve o problema, é provável que seja um erro de sistema versus um erro aleatório. As seguintes fontes de erros mais comuns devem ser investigadas para certificar-se de que:

- a solução padrão de turbidez não expirou, está sendo armazenada corretamente, atende aos requisitos de desempenho (ver Seção 5,1) e foi misturada corretamente antes de ser usada;
- todos os materiais usados estão dentro do prazo de validade e foram armazenados na temperatura correta;
- o incubador está na temperatura e atmosfera corretas;
- outros equipamentos usados (ex., pipetas) estão funcionando adequadamente;
- as placas foram armazenadas na temperatura correta;
- a cepa de controle de qualidade não foi mudada e não está contaminada;
- as suspensões de inóculo foram preparadas e ajustadas corretamente; e
- o inóculo para o teste foi preparado a partir de uma placa incubada durante o período correto e não tem, em qualquer circunstância, mais de 24 horas.

Poderá ser necessário obter uma nova cepa de controle de qualidade (seja do congelador onde está armazenada ou de uma fonte confiável) e novos lotes de materiais (incluindo novas soluções padrão de turbidez), possivelmente de outros fabricantes. Se o problema parece estar relacionado com um determinado fabricante, ele deve ser contactado. Também é útil trocar cepas de controle de qualidade e materiais com outro laboratório que use o mesmo método, a fim de determinar a fonte dos problemas inexplicados no sistema de testes. Até que o problema seja resolvido, poderá ser necessário usar um método alternativo de teste.

Quando o problema tiver sido resolvido, a fim de voltar ao esquema de testes semanais de controle de qualidade, será imprescindível documentar um desempenho satisfatório durante outros 20 ou 30 dias consecutivos (ver a Seção 12.7.2.1).

12.10 Relatando os Resultados Quando Ocorrem Testes Fora do Padrão

Sempre que ocorrer um resultado fora do padrão ou for necessário tomar uma medida corretiva, será preciso avaliar, cuidadosamente, se os resultados de patologia clínica devem ser relatados em base individual, avaliando se a fonte do erro, quando conhecida, pode afetar os resultados relevantes de patologia clínica. As opções a serem consideradas incluem suprimir os resultados de um determinado agente antimicrobiano; revisar, retrospectivamente, os dados do paciente ou os dados acumulados para padrões pouco usuais; e usar uma metodologia alternativa, ou um laboratório de referência, até resolver o problema.

12.11 Verificação dos Resultados Clínicos

Diversos parâmetros dos testes são monitorados quando se adotam as recomendações de controle de qualidade descritas nesta Norma. Entretanto, resultados aceitáveis derivados dos testes de cepas de controle de qualidade não garantem resultados acurados nos testes de isolados clínicos. É importante analisar todos os resultados obtidos, de todas as drogas testadas, num isolado clínico, antes de liberar os resultados. Isso inclui, sem se limitar a, assegurar-se de que: 1) os resultados de sensibilidade antimicrobiana são coerentes com a identificação do isolado; 2) os resultados de agentes individuais com uma classe específica de drogas acompanham a hierarquia estabelecida pelos padrões de atividade (ex., as cefalosporinas de terceira geração são mais ativas do que as cefalosporinas de primeira e segunda geração contra as Enterobacteriaceae); e 3) o isolado é sensível àqueles agentes para os quais ainda não foi documentada resistência (ex., vancomicina e *Streptococcus* spp.) e para os quais o único critério interpretativo na Norma M100 é o de “sensível”.

Os resultados pouco usuais ou incoerentes devem ser verificados checando os seguintes elementos: 1) erros de transcrição; 2) contaminação do teste (verificar novamente a pureza das placas, etc.); e 3) uso de placa, painel, ou cartão defeituoso (ex., quebrado, preenchimento incompleto, etc.); e 4) resultados anteriores daquele paciente (ex., Esse paciente teve anteriormente um antibiograma incomum com o mesmo isolado?). Se não for possível descobrir a causa do resultado incomum ou incoerente, será necessário repetir o teste de sensibilidade ou a identificação do microorganismo, ou ambos. É útil, algumas vezes, usar uma metodologia alternativa para repetir o teste. A Tabela 4 da Norma M100 fornece uma lista de resultados que vale a pena consultar. Cada laboratório deve desenvolver suas próprias políticas de verificação de resultados incomuns ou incoerentes de testes de sensibilidade antimicrobiana. Essa lista deve enfatizar aqueles resultados que podem ter um impacto significativo no tratamento dos pacientes.

12.12 Outros Testes de Controle

12.12.1 Controle de Crescimento

Cada placa de microdiluição em caldo, série de macrodiluição em caldo e série de placas de diluição em ágar deverá incluir um controle de crescimento em meio basal, sem agente antimicrobiano, a fim de avaliar a viabilidade dos organismos do teste. Em ambos os testes em caldo, o controle de crescimento também serve como controle de turbidez para a leitura dos pontos finais.

12.12.2 Controle de Pureza

Após a inoculação nos testes de diluição em ágar ou caldo, esfrega-se cada inóculo numa placa apropriada de ágar. Essa placa deverá ser incubada durante a noite, a fim de detectar culturas misturadas e fornecer colônias recém isoladas, se for necessário repetir o teste. Esse passo é especialmente importante no caso dos testes de diluição em caldo, nos quais as misturas de culturas passam despercebidas com muita facilidade.

12.12.3 Controle de Inóculo

A contagem das placas é realizada periodicamente usando inóculos representativos, de maneira a assegurar que a solução padrão de McFarland 0,5 e os procedimentos de normatização e diluição dos inóculos continuam sob controle. Imediatamente após a inoculação, retiram-se amostras, para fins de contagem de placas, do poço de controle de crescimento das placas de microdiluição, do tubo de ensaio de controle de crescimento nas séries de macrodiluição, ou (no caso de diluição em ágar) de um poço selecionado aleatoriamente do bloco replicador de sementes.

12.12.4 Controle da Interpretação dos Pontos Finais

A interpretação dos pontos finais deve ser monitorada periodicamente para minimizar possíveis variações na interpretação dos pontos finais dos testes de CIM entre os observadores. Todos os técnicos de laboratório que realizam esses testes devem realizar leituras independentes de um conjunto selecionado de testes de diluição. Os resultados devem ser registrados e comparados com os resultados obtidos por um técnico experiente. Todas as leituras deverão estar dentro de ± 1 incremento de concentração 2X, uma da outra.²⁴

13 Limitações da Metodologia dos Testes de Diluição

13.1 Aplicação aos diversos Grupos de Organismos

Os testes de diluição descritos neste documento foram padronizados para testes de patógenos de crescimento rápido, que incluem *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., as Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* e *Bacillus anthracis* e foram modificados para testar alguns organismos fastidiosos, como *Haemophilus* spp. (Tabela 2E), *N. gonorrhoeae* (Tabela 2F), estreptococos (Tabelas 2G e 2H) e *Helicobacter pylori* (Tabela 2J).

13.2 Resultados Enganadores

Podem ocorrer resultados perigosamente enganadores quando certos agentes antimicrobianos são testados e relatados como sensíveis contra organismos específicos. Essas combinações incluem as seguintes, embora possam não se limitar as mesmas:

- cefalosporinas de primeira e segunda geração e aminoglicosídeos contra *Salmonella* e *Shigella* spp.;
- todos os agentes antimicrobianos β -lactâmicos (excetuando-se oxacilina, meticilina e nafcilina) contra estafilococos resistentes a meticilina;
- cefalosporinas, aminoglicosídeos (com exceção dos testes para alto nível de resistência), clindamicina e trimetoprim-sufametoxazol contra enterococos; e
- cefalosporinas contra *Listeria* spp.

13.3 Surgimento de Resistência

Alguns agentes antimicrobianos estão associados com o surgimento de resistência durante cursos prolongados de terapia. Assim, isolados inicialmente sensíveis podem se tornar resistentes nos três ou quatro primeiros dias após o início da terapia. Isso ocorre com mais frequência em *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia* spp. com as cefalosporinas de terceira geração; em *P. aeruginosa* com todos os agentes antimicrobianos; e nos estafilococos com as quinolonas.

Em certas circunstâncias, justifica-se a repetição dos testes antes mesmo dos três ou quatro dias iniciais, sendo que a decisão de retestar só exige conhecimento da situação específica e da gravidade da condição do paciente. As diretrizes laboratoriais relativas à repetição dos testes devem ser definidas após consulta ao corpo médico.

14 Testes de Triagem

A confiabilidade dos testes de triagem para *Staphylococcus aureus* oxacilina-resistente e enterococos com alta resistência aos aminoglicosídeos têm se mostrado comparável à dos testes padrão na detecção de resistência clinicamente significativa, tornando desnecessária a realização de testes confirmatórios adicionais. As limitações de outros testes de triagem, ex., para resistência a vancomicina nos enterococos (Tabela 2D) e ESBLs em certas Enterobacteriaceae (Tabela 2A), sendo que a necessidade de confirmação ulterior é apresentada nas tabelas individuais.

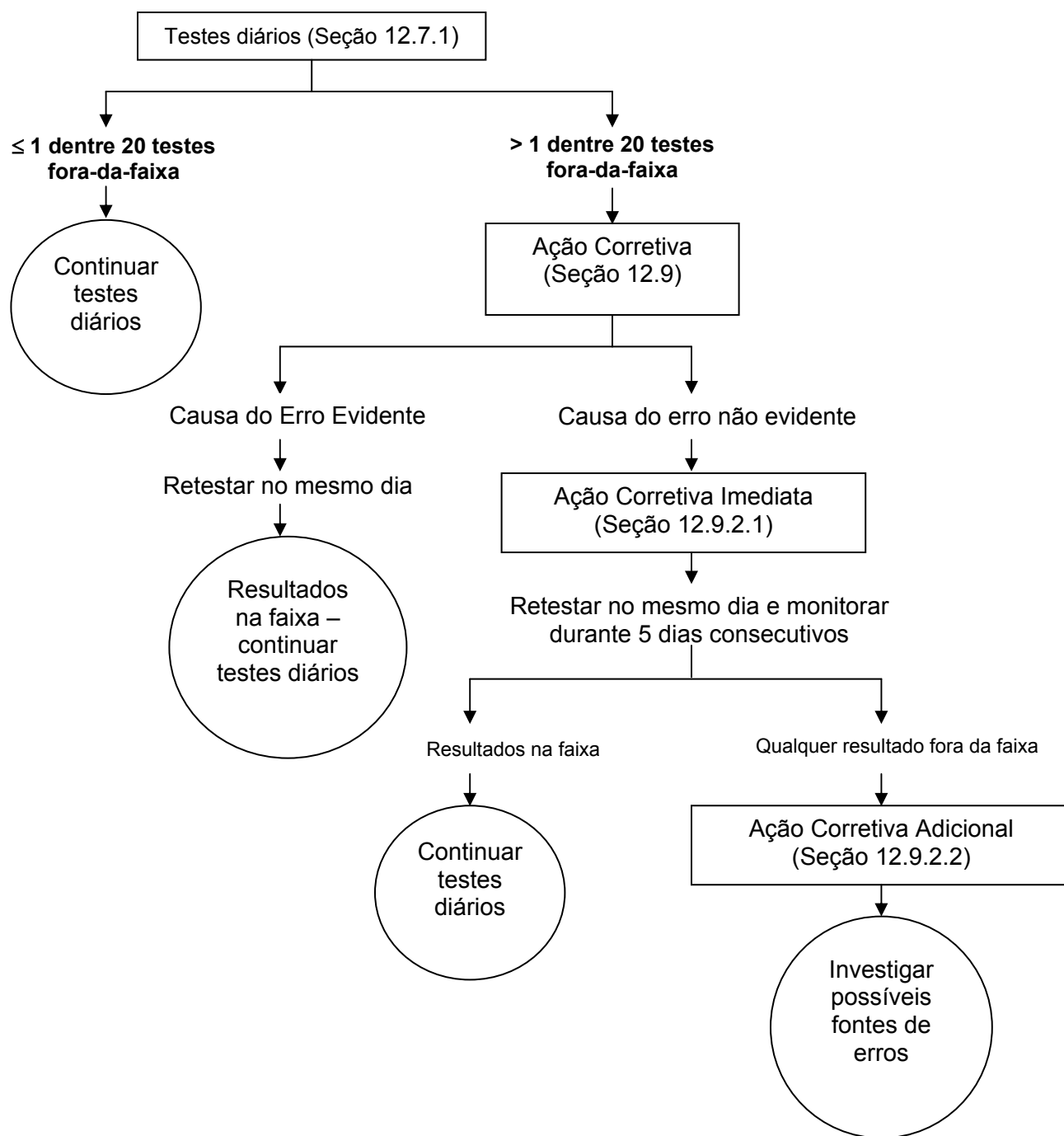
Referências**Bibliográficas**

- ¹ Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1971;217(suppl B):1-90.
- ² Jorgensen JH, Turnidy JD, Washington JA. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al, eds. *Manual of Clinical Microbiology.* 7th ed. Washington DC: American Society for Microbiology. 1999:1526-1543.
- ³ Steers E, Foltz EL, Graves BS. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiotic Chemother.* 1959;9:307-311.
- ⁴ Jones RN, Gavan TL, Thornberry C, et al. Standardization of disk diffusion and agar dilution susceptibility tests for *Neisseria gonorrhoeae*: Interpretive criteria and quality control guidelines for ceftriaxone, penicillin, spectinomycin, and tetracycline. *J Clin Microbiol.* 1989;27:2758-2766.
- ⁵ Rousseau D, Harbec PS. Delivery of the 1- and 3-mm pins of a Cathra replicator. *J Clin Microbiol.* 1987;25:1311.
- ⁶ Surprenant AM, Preston DA. Effect of refrigerated storage on cefaclor in Mueller-Hinton agar. *J Clin Microbiol.* 1985;21:133-134.
- ⁷ Jorgensen JH, Redding JS, Maher LA, Howell AW. Improved medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol.* 1987;25:2105-2113.
- ⁸ Barry AL, Jones RN, Gavan TL. Evaluation of the Micro-Media System for quantitative antimicrobial drug susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978;13:61-69.
- ⁹ Thornsberry C, McDougal LK. Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *J Clin Microbiol.* 1983;18:1084-1091.
- ¹⁰ Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistência in coagulase-negative staphylococci. *N Engl J Med.* 1987;316:927-931.
- ¹¹ Kremery V Jr., Trupl J, Drogna L, Kukuckova E, Oravcova E. Nosocomial bacteremia due to vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in four patients with cancer, neutropenia, and previous treatment with vancomycin. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis.* 1996;115:259-261.
- ¹² Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40:135-136.
- ¹³ Centers for Disease Control and Prevention. Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin - United States. *MMWR.* 1997;46:813-815.
- ¹⁴ Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA, et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibility to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1020-1027.
- ¹⁵ Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. *MMWR.* 2002;51(26):565-567.

- ¹⁶ Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Dispatch: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MMWR*. 2002;51(40):902.
- ¹⁷ Torres C, Tenolio C, Lantero M, Gastãnares M, Baquero F. High-level penicillin resistance and penicillin-gentamicin synergy in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:2427-2431.
- ¹⁸ Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci. *Am J Med*. 1997;102:284-293.
- ¹⁹ Swenson JM, Clark NC, Ferraro MJ, Sahm DF, Doern G, Pfaller MA, et al. Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*. 1994;32:1700-1704.
- ²⁰ Jorgensen JH, McElmeel ML, Trippy CW. Comparison of inoculation methods for testing enterococci by using vancomycin screening agar. *J Clin Microbiol*. 1996;34:2841-2842.
- ²¹ Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35:1697-1704.
- ²² Swenson JM, Hindler JA, Peterson LR. Special tests for detecting antibacterial resistência. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington DC: American Society for Microbiology. 1999:1563-1577.
- ²³ Doern GV, Tubert TA. Detection of β -lactamase activity among clinical isolates of *Branhamella catarrhalis* with six different β -lactamase assays. *J Clin Microbiol*. 1987;25:1380-1383.
- ²⁴ Barry AL, Braun LE. Reader error in determining minimal inhibitory concentrations with microdilution susceptibility test panels. *J Clin Microbiol*. 1981;3:228-230.

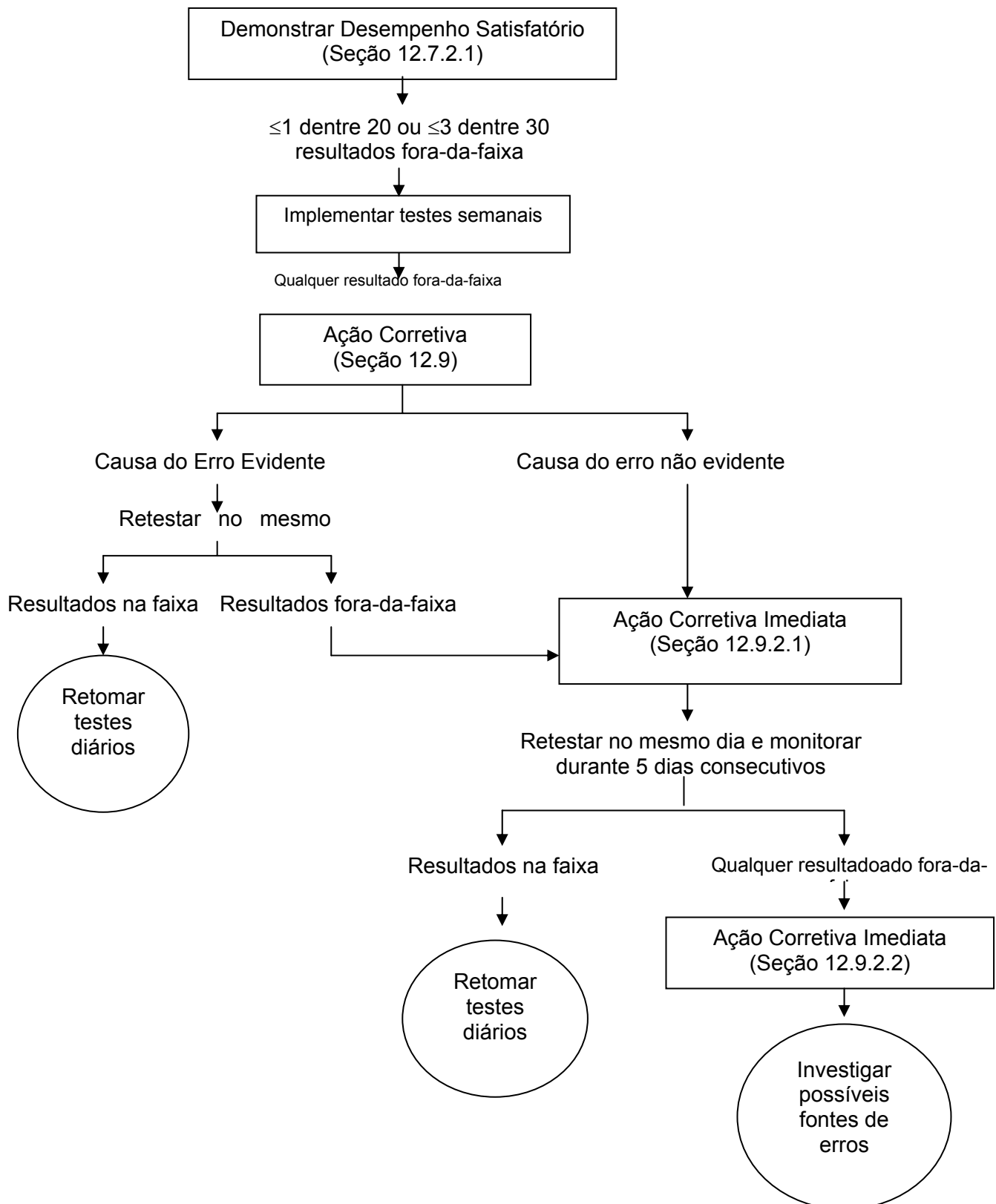
Apêndice A. Fluxogramas do Protocolo de Controle de Qualidade

Protocolo dos Testes Diários de Controle de Qualidade para Diluição Aeróbica



Apêndice A. (Continuação)

Protocolo dos Testes Semanais de Controle de Qualidade para Diluição Aeróbica



Os procedimentos consensuais do NCCLS incluem o processo de recurso descrito, detalhadamente, na Seção 9.0 dos Procedimentos Administrativos. Para mais informações, favor contactar os Escritórios Executivos ou visitar nosso website em www.nccls.org.

Resumo dos Comentários e das Respostas do Subcomitê

M7-A5: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Fifth Edition*

Geral

1. Estamos testando um painel de agentes antimicrobianos contra *Moraxella catarrhalis* para pacientes na nossa área. Temos a seguinte pergunta.

Gostaríamos de saber se seria possível desenvolver normas interpretativas para *Moraxella catarrhalis* no futuro. Deveremos enviar, no futuro, apenas o valor da CIM no relatório do paciente, mas não temos normas de interpretação (S, I, ou R) que possam ser anexadas. Existe algum método que poderíamos utilizar para interpretar esses resultados? Além disso, deveremos enviar os resultados com um comentário explicando que não é um método padrão. Por favor, comente e forneça alguma informação que possamos utilizar.

- **A atual recomendação na Seção 10 é usar um teste de β -lactamase para detectar resistência a penicilina, ampicilina, and amoxicilina para *M. catarrhalis*. A necessidade de um método de teste específico e critérios interpretativos para esses e outros agentes contra este organismo é uma questão que o subcomitê espera focalizar no futuro.**

Seção 3.1

2. Seguimos as diretrizes do NCCLS ao preparar nossos painéis internos congelados de CIM, e isso tem sido relativamente fácil para nos uma vez que a potência da droga fornecida pela empresa farmacêutica é claramente indicada no frasco. Vamos preparar uma série de placas de CIM para as quais o patrocinador forneceu o pó, mas a potência não foi indicada. O certificado de análise específica o “valor de ensaio” (que é um percentual). A empresa farmacêutica nos recomendou que ajustássemos nossos cálculos para teor de água (~ 8%), mas isso não é discutido na Norma M7 do NCCLS. Trata-se de alguma coisa que deveríamos estar fazendo?

- **Foi acrescentada uma explicação ao documento (ver a Seção 3.2) esclarecendo essa questão.**

Seções 6.1 e 6.3

3. Estamos realizando testes *in vitro* de novos agentes antibióticos contra *Streptococcus* spp. usando os testes recomendados pelo NCCLS na Norma M7-A4. Temos tido uma correlação muito ruim entre nossa microdiluição, diluição em ágar e os testes de sensibilidade Kirby Bauer. Tenho duas perguntas para o comitê.
 - a). Gostaria de saber o raciocínio histórico subjacente à escolha, pelo comitê, de LHB (sangue lisado de cavalo) como suplemento dos meios nos testes de microdiluição, porque a suplementação, para os meios para os testes Kirby Bauer de diluição em ágar, é sangue de carneiro.
 - **O sangue lisado de cavalo foi selecionado para o método de microdiluição porque fornece um crescimento muito bom dos isolados clínicos de pneumococos e porque 1) tem sido usado**

durante bastante tempo, por vários laboratórios com conhecimentos especializados nos testes de pneumococos; 2) constitui um meio claro; e 3) não contém os inibidores de trimetoprim ou sulfonamida presentes em sangue de outras origens. Após tomar essa decisão, descobriu-se que o sangue de carneiro não parecia inibir a ação de sulfametoxazol-trimetoprim sobre os pneumococos, como acontecia com outros organismos e que havia uma correlação muito boa da CIM com os diâmetros do halo quando se usava sangue de carneiro nos testes de disco difusão com pneumococos.

- b) Atualmente, o único método recomendado para a preparação do inóculo de *Streptococcus pneumoniae* é utilizando a suspensão padrão de McFarland 0.5 a partir de uma placa de ágar sangue de carneiro incubado durante a noite. No nosso laboratório, esse método produz, sistematicamente, um inóculo ligeiramente mais fraco do que o esperado (aproximadamente 10^7 UFC/mL). O método de cultura em caldo, recomendado para outros organismos, poderia ser uma alternativa viável para obter o inóculo apropriado?
- **Sabemos que, com algumas cepas de pneumococos, a suspensão de McFarland 0,5 não produz a contagem pretendida de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Entretanto, tanto com os pneumococos como com *Haemophilus spp.*, a idade da placa a partir da qual o inóculo foi preparado pode afetar as contagens finais (ver a Seção 7.3.1). As suspensões de inóculo para os pneumococos devem ser preparadas a partir de uma placa de, no máximo, 18 a 20 horas. Preferimos o método de preparação direta do inóculo para os pneumococos, porque o crescimento desses organismos, assim como o de outros organismos fastidiosos, é imprevisível em meio de caldo.**

Seção 7.3.1

4. Eu encontrei um possível erro na Seção 7.3.1 (4) – sob Testes de Diluição em Caldo. Após repetidos cálculos, acreditamos que a frase “Após homogeneizar, espalha-se uma alíquota de 0,1mL . a presença de aproximadamente 50 colônias indicaria uma densidade de 5×10^5 UFC/mL” é incorreta. A alíquota deveria ser 0,001mL (ou 1µL) para se conseguir ~50 colônias.
- **O subcomitê tem usado o seguinte cálculo. Se há 5×10^5 UFC/mL no poço da placa de CIM e fazemos uma diluição de 1:1000 nele (acrescentando 0,01mL a 10mL), teremos 5×10^2 UFC/mL (ou 500 UFC/mL). Se, a seguir, colocamos 0,1mL disso em BAP, deveremos ter ~50 colônias.**

Seções 9.2.1 e 9.3

5. Eu aprecio o formato mais ‘amigável’ ao usuário destas normas adotadas recentemente. Por favor, estenda nossos cumprimentos ao subcomitê pelo excelente trabalho de melhorar os textos das Normas M2 e M7.

Nossa única preocupação sobre esse tópico é que a indústria não está atendendo as recomendações do NCCLS fornecendo produtos fáceis de obter (especialmente, automatizados) para lidar com as questões emergentes na área de testes de sensibilidade antimicrobiana. Os exemplos de mudanças recentes para as quais não há soluções de fácil obtenção e implementação inclui ESBLs (M7-A5, Seção 9.3) e os enterococos resistentes à penicilina/ampicilina (M7-A5, Seção 9.2.1). Estamos gratos que o NCCLS estuda minuciosamente e define essas questões, mas também nos sentimos frustrados pelo volume crescente de testes manuais, *off-line*, necessário para atender essas recomendações.

São muitos os fatores que contribuem para esta situação, incluindo o tempo necessário para se obter aprovação do FDA para novos produtos e métodos. Esse não é verdadeiramente um problema do NCCLS, mas uma realidade em um ambiente de laboratório médico que muda com muita rapidez.

- **As ações consideradas ótimas são incorporadas a nossos documentos no formato de recomendações; entretanto, é evidente que, à medida que surgem novos mecanismos de resistência, as recomendações em vigor podem deixar de ser ótimas e, então, é preciso elaborar novas recomendações complementares para os testes. Sempre que possível, continuaremos a refinar os métodos básicos para minimizar a necessidade de testes adicionais.**
6. Na Norma M7-A5, Seção 9.2.1 (M2-A7, Seção 6.5.1), o NCCLS recomenda os testes de CIM de *E. faecium* (recuperado de sangue ou LCR) com ampicilina e penicilina. A finalidade é testar a sensibilidade da sinergia potencial com os aminoglicosídeos. Não encontro isso na Norma M100-S11. Ainda é recomendado?
- **Na Norma M7-A6, continuamos a sugerir que, para cepas de *E. faecium* resistentes à penicilina ou ampicilina, pode ser apropriado determinar as CIMs reais, uma vez que cepas com CIMs ≤ 64 $\mu\text{g/mL}$ com penicilina, ou ≤ 32 $\mu\text{g/mL}$ com ampicilina, podem responder a tratamento com um β -lactâmico + um aminoglicosídeo na ausência de resistência de alto nível aos aminoglicosídeos. Entretanto, uma vez que se trata de passo opcional, que pode valer a pena em raras circunstâncias, quando solicitado pelo especialista em doenças infecciosas que trata de um paciente acometido por infecção grave, acreditamos que é apropriado mencioná-lo apenas no texto, e não nas tabelas. O teste pode ser realizado usando um método de CIM baseado em diluição em caldo ou ágar.**

Seção 12.7.2.2

7. Na tentativa de reduzir os custos laboratoriais sem comprometer a atenção aos pacientes, tenho revisado os requisitos de controle de qualidade para os testes de sensibilidade. Utilizamos atualmente o sistema VITEK. Perguntei ao departamento de controle de qualidade de Bio-Merieux o seguinte: Vocês interpretam o diluente salino como um reagente componente do seu sistema? Atualmente, compramos solução salina preparada de Bio-Merieux para uso com o sistema VITEK e, com frequência, recebemos soluções de diversos lotes, conforme atestado pelos números de lote. Me disseram que eles não têm essa recomendação, mas que eu deveria verificar a documentação do NCCLS. Dependendo de como se interpreta a Norma M7-A5 do NCCLS, página 20 (Seção 12.7.2.2): Realizar testes de controle de qualidade uma vez por semana e sempre que for mudado qualquer reagente do teste, o laboratório poderá estar fazendo controle de qualidade duas ou três vezes por semana. No nosso laboratório, queremos realizar os teste de maneira apropriada e correta, mas sem trabalho ou despesas extras. Quando começamos a usar o sistema VITEK, considerávamos que a solução salina era um reagente componente, mas gostaria que isso fosse esclarecido por aqueles que pesquisam e escrevem as diretrizes dos testes. Gostaria que me esclarecessem essa questão.
- **Consideramos a solução salina e/ou a água utilizada para preparar o inóculo como um reagente componente que não precisa de testes de um lote para outro. Entretanto, o risco tanto com água como com solução salina é a contaminação, especialmente quando se usa dosadores de repetição para medir as alíquotas na preparação do inóculo. Nos testes de CIM, recomenda-se verificar a pureza usando um meio não-seletivo, e, então, pode se eliminar qualquer suspeita de contaminação cada vez que o teste é realizado.**

Seção 12.7.2.2

8. Após a instituição ter estabelecido que o CQ pode ser realizado semanalmente, usando os protocolos de teste que prevêem 30 dias consecutivos de testes, eu acredito que é excessiva a instituição se ver forçada a realizar testes durante 30 dias consecutivos com várias cepas quando uma nova droga, ou painel é incorporado, sendo que a metodologia dos testes permanece inalterada. Por exemplo, usamos o instrumento Vitek para os testes de CIM. Realizamos testes de CQ durante 30 dias para três tipos diferentes de painel de CIM, com múltiplas cepas de CQ, conforme recomendando e não tivemos

qualquer falha de CQ. Conforme as atuais diretrizes, se quisermos selecionar ou atualizar um painel, deveremos executar os testes de CQ, novamente, com múltiplas cepas.

Eu recomendo que sejam realizados testes de CQ num esquema de cinco ou sete dias consecutivos, ao invés de 30 dias, se o painel for mudado mais o método permanecer inalterado. Meu raciocínio é o seguinte: 1) o fabricante já realizou muitos testes de CQ nos painéis antes de colocá-los no mercado; 2) a instituição de patologia clínica já realizou P&D e testes de CQ durante 30 dias e, portanto, tem a experiência necessária; 3) os laboratórios, em geral, são constantemente pressionados a cortar custos, dos quais CQ excessivo representa um componente substancial; e 4) os painéis mudam com frequência devido à disponibilidade de drogas e mudanças nas recomendações.

Isso me parece razoável porque, nos meus 20 anos realizando testes de CIM, nunca tive uma falha de CQ de 30 dias com os diversos métodos utilizados. É prudente executar testes de CQ durante 30 dias toda vez que se muda o método, mas, uma vez estabelecido, eu acredito ser excessivo testar durante 30 dias quando cinco ou sete dias consecutivos de testes confirmariam o que o fabricante já provou.

- **Embora as recomendações originais de controle de qualidade baseavam-se em pressupostos estatísticos, e não em dados reais, relutamos em mudá-las sem estudos válidos ou outro elemento de sustentação mostrando que um esquema de testes menos frequentes demonstraria se o desempenho é adequado. Com base nos atuais critérios de desempenho aceitável de controle de qualidade (Seção 12.7), acrescentou-se uma opção de protocolo com 20 dias de testes, para poder passar de testes de controle de qualidade diários para semanais. Essa opção inclui um protocolo simplificado com limites aceitáveis de confiança. O subcomitê avaliará enfoques alternativos no futuro, visando a simplificar ainda mais o controle de qualidade. Por enquanto, acreditamos que acrescentar uma nova droga (no caso de mudança ou atualização de um painel) é uma circunstância que justifica testes durante 20 ou 30 dias.**

Seção 12.9.1

9. A parte desta recomendação que acredito é excessiva diz respeito aos testes de CQ durante cinco dias consecutivos recomendados no caso de uma droga falhar no CQ sem razão aparente.

Eu recomendo que o painel/droga seja repetido imediatamente e, se estiver O.K., não haverá necessidade de qualquer ação ulterior. Meu raciocínio é o seguinte: 1) se podemos errar três vezes durante 30 dias consecutivos de testes de CQ, então parece incoerente presumir que não teremos um erro aleatório ocasional com os testes semanais; 2) na minha experiência com a ocorrência ocasional de uma droga fora-do-controle, a repetição sempre foi aceitável; e 3) diminuir os custos eliminando desperdício é cada vez mais importante para os laboratórios.

Na minha proposta de repetir o teste uma só vez, ao invés de cinco dias consecutivos de testes, no caso de o teste repetido não se encaixar na faixa aceitável, esse teste repetido seria seguido por um protocolo de cinco dias de testes, conforme delineado no documento.

- **Conforme colocamos na resposta ao comentário 7, relutamos em mudanças as recomendações sem dados suficientes para sustentar a mudança.**

Tabelas

10. A formulação oral de cefuroxima fornece concentrações séricas e tissulares mais baixas do que a formulação parenteral. De maneira que, para os organismos gram-negativos, os pontos de corte para as formulações orais são mais baixos do que para as formulações parenterais. Isso está certo. O que eu não entendo, e acredito que esteja errado na Norma M100-S10 (M7), Tabela 2G, é que os pontos de corte da cefuroxima oral sejam mais altos (1 e 4µg) do que os da cefuroxima parenteral (0,5 e 2µg),

no caso dos pneumococos. Alguém poderia verificar esse item? Qualquer erro tem consequências abrangentes, uma vez que a formulação oral é entendida, em geral, e o risco de seleção de resistência aumenta.

- **O ponto de corte da sensibilidade a cefuroxima sódica (parenteral) para *Streptococcus pneumoniae* é mais baixo do que o valor da cefuroxima axetil (oral) porque a cefuroxima foi aprovada pelo FDA para o tratamento da meningite pneumocócica. As concentrações menores da droga atingidas no fluido cerebrospinal (LCR), comparadas com as concentrações séricas, exigem ponto de corte mais baixo.**
11. Eu tenho uma pergunta relativa aos atuais pontos de corte da gentamicina para *Pseudomonas*. Atualmente, uma CIM =4 para gentamicina deve ser lida como sensível e =8 como intermediária. Entretanto, considerando a dosagem de gentamicina praticada, se o paciente estiver recebendo a dosagem tradicional (ex., 1-1,5mg/kg, a cada 8-12h), quase nunca serão alcançadas concentrações superiores à 6-9µg/mL e, mais realisticamente, essas concentrações deverão variar de 5 a 7µg/mL. Essas concentrações séricas são apenas 1-2X a CIM do organismo. Com a “dose diária única” (7mg/kg), os picos de gentamicina ficam, em geral, entre 13 e 20µg/mL; melhor, mas ainda longe do ideal para um organismo com uma CIM de 4. É evidente que nem todos os pacientes são candidatos à “dose diária única” de gentamicina (i.e., idosos, baixa taxa de depuração (*clearance*) de creatinina, hipermetabólicos, etc.), pelo que é preciso administrar dosagens tradicionais a esses pacientes.

Como vocês sabem, a meta subjacente às doses diárias únicas de aminoglicosídeos é maximizar a farmacocinética e farmacodinâmica dessas drogas, através da maximização da razão pico: CIM, conseguindo, assim, uma eliminação melhor e mais rápida do microorganismo, com uma toxicidade potencialmente menor. Em geral, acredita-se que a melhor maneira de se conseguir esse efeito é atingir um pico de 8-10X o valor da CIM. Para um organismo com CIM =4, isso não é nem remotamente possível com segurança.

Minha preocupação, portanto, é que esses pontos de corte de CIM (4 e 8) não refletem as questões práticas relativas às dosagens de gentamicina (e tobramicina) na prática clínica. Eu estou interessado em seus comentários relativos a essa questão e se isso já foi, ou não, discutido, ou se pontos de corte alternativos têm sido propostos.

- **A farmacodinâmica não é o único critério usado pelo NCCLS para desenvolver os critérios de interpretação. Um ponto mais baixo para gentamicina dividiria a distribuição da população de CIMs com *Pseudomonas aeruginosa*. Pequenos fatores técnicos, sem controle, poderiam, então, determinar se um organismo deveria ser, ou não, considerado sensível. Embora os atuais pontos de corte sejam adequados para monoterapia de infecções do trato urinário, recomendamos terapia combinada, com doses máximas, no caso de infecções graves por *Pseudomonas* (ver a Tabela 2B, comentário 4, da Norma M100).**
12. Eu estou procurando diretrizes para a frequência ótima de repetição de testes de sensibilidade de isolados de bactérias provenientes de um mesmo paciente e fonte. Uma nota de rodapé nas diretrizes da M100-S9 explica que duas combinações organismo/antimicrobiano (*Staphylococcus* spp. versus quinolonas e *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia* spp. versus cefens) poderão exigir a repetição dos testes de sensibilidade três ou quatro dias após o início da terapia, mas não fornece qualquer outra recomendação geral para a repetição dos testes de sensibilidade. Existe alguma outra informação disponível sobre essa questão?
- **Conforme colocado na Seção 13.3, “Alguns agentes antimicrobianos estão associados com o surgimento de resistência durante terapia prolongada. Portanto, isolados inicialmente sensíveis podem se tornar resistentes após o início da terapia. Isso ocorre nos três ou quatro dias após o início da terapia, e mais frequentemente em *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia* spp. com as**

cefalosporinas de terceira geração; em *P. aeruginosa* com todos os agentes antimicrobianos; e nos estafilococos com as quinolonas.” Relatamos em explicitar o número de dias antes de repetir o teste, exceto quando sabemos que, se o teste não for repetido, poderá ocorrer erro médico grave. Em certas circunstâncias, a repetição do teste justifica-se antes dos três ou quatro dias, com base na situação específica e na gravidade da condição do paciente. As diretrizes laboratoriais sobre quando repetir testes de sensibilidade devem ser estabelecidas após consultas ao corpo médico. Na geração de antibiogramas, os resultados dos testes repetidos devem ser excluídos, conforme recomendado na Norma M39—*Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data* do NCCLS.

13. Escrevo em relação ao ponto de corte da CIM de ciprofloxacina contra *S. typhi*. Conforme as recomendações do NCCLS, $\leq 1\mu\text{g/mL}$ significa sensível e $\geq 4\mu\text{g/mL}$, resistente. Seguimos esse critério nos relatórios sobre a CIM de ciprofloxacina. Temos isolado cepas de *S. typhi* com CIMs de até $0,5\mu\text{g/mL}$, em pacientes que não respondem clinicamente ao tratamento com ciprofloxacina, e os clínicos nos dizem que a febre só diminui após sete dias de tratamento. Essa tem sido a experiência de vários centros na Índia e as cepas de alguns desses centros, que nos foram enviadas, também têm uma CIM $\leq 1\mu\text{g/mL}$. O tamanho do halo correspondente no teste de disco difusão é de 21 a 22mm. Temos monitorado essa elevação da CIM no nosso centro.

Devemos continua com o ponto de corte da CIM conforme recomendado?

- **Quando esses pontos de corte foram desenvolvidos inicialmente, a resistência a fluoroquinolona ainda não tinha sido documentada. Também estamos cientes de vários relatórios, na literatura, relativos a fracassos clínicos em que os atuais pontos de corte são usados para detectar resistência a fluoroquinolona em *Salmonella*. O subcomitê deverá em breve revisar os dados existentes sobre essa questão. Uma vez que temos dados insuficientes para mudar os atuais pontos de corte nesta oportunidade, acrescentamos a seguinte sugestão à Tabela 2A (comentário 13), que diz o seguinte: “As cepas de *Salmonella* com resultados do teste de sensibilidade classificando-as como sensíveis a ácido nalidíxico podem estar associadas com fracasso clínico ou resposta demorada em pacientes de salmonelose extra-intestinal tratados com fluoroquinolona. Deve-se considerar a realização de testes de isolados extra-intestinais de *Salmonella* para resistência ao ácido nalidíxico.”**
14. Qual é o raciocínio subjacente aos diferentes pontos de corte de levofloxacina, gatifloxacina e moxifloxacina no caso de *Streptococcus pneumoniae*? Em geral, moxifloxacina e gatifloxacina têm CIMs mais baixos do que levofloxacina, conforme demonstrado nos dados do estudo SENTRY (*Clinical Infectious Diseases* 2001; 32(Suppl 2): S81-93). Atualmente, o NCCLS não estabelece pontos de corte para ciprofloxacina contra *Streptococcus pneumoniae*. Eu acredito que os atuais pontos de corte levam os clínicos a concluir que todas as fluoroquinolonas são essencialmente equivalentes contra *Streptococcus pneumoniae*.
- **Para cada uma das três quinolonas, os pontos de corte citados foram estabelecidos com base numa análise da atividade *in vitro* do respectivo agente, incluindo sua atividade contra pneumococos com resistência bem caracterizada, devida a mutação nos genes que afetam as enzimas-alvo – girase e topoissomerase – nessa classe. Além disso, avaliou-se, independentemente, a farmacocinética e a farmacodinâmica de cada agente, incluindo a relação entre a área sob a curva e a concentração inibitória mínima (AUC/CIM) das concentrações livres da droga para cada agente. Por último, analisaram-se os dados de ensaios clínicos descrevendo as taxas de respostas clínica e bacteriológica para cada agente. Assim, cada droga foi avaliada individualmente, com base em dados específicos para o respectivo agente, e não como um ensaio comparativo dos três produtos. O NCCLS não estabeleceu pontos de corte para a ciprofloxacina, devido, em parte, ao fato de que os especialistas que tratam infecções por pneumococos não defendem seu uso terapêutico nessas infecções, e, também, porque não faz**

parte da relação de drogas recomendadas para o tratamento de pneumonia adquirida na comunidade de quaisquer das diretrizes publicadas.

15. Estamos nos debatendo com algumas questões relativas os testes de referência de sensibilidade antimicrobiana das espécies de *Streptococcus*, incluindo *S. pneumoniae*. A Norma M7-A5 do NCCLS, na Seção 8, recomenda que os testes de sensibilidade antimicrobiana sejam realizados usando caldo Mueller-Hinton ajustado por cátion e suplementado com sangue lisado de cavalo. Entretanto, o sangue lisado de cavalo pode ser acrescentado quando se preparam os painéis para o teste de sensibilidade antimicrobiana antes de congelá-los, ou quando os painéis são inoculados (método de diluição em microcaldo). Gostaríamos de fazer as seguintes perguntas: 1) Há alguma dúvida ou impacto nos resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana devido ao acréscimo de sangue lisado de cavalo aos painéis dos testes de sensibilidade antimicrobiana? 2) Ambos os métodos de acrescentar sangue lisado de cavalo ao caldo atendem as atuais diretrizes do NCCLS que definem os painéis de referência para uso nos testes de sensibilidade antimicrobiana para *Streptococcus*?

- **Foi acrescentada uma explicação sobre essa questão (ver a Seção 7.1).**

16. Sabemos que existem normas em vigor para *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter* spp., mas não estamos cientes, entretanto, de qualquer norma disponível para quaisquer dos outros membros desse grupo.

Temos considerado várias opções para os testes de sensibilidade desses organismos incomuns, a saber:

I. Declarar que não há normas existentes e que não é possível realizar testes de sensibilidade.

ii. Realizar um teste de diluição em caldo para obter a CIM e relatar os resultados sem interpretação ‘S, I, R’, incluindo um comentário no sentido de que não existe referência validada vigente para os testes e que os dados de sensibilidade não estão necessariamente correlacionados com a atividade clínica.

iii. Enviar o isolado a um laboratório de referência.

- **Só existe uma metodologia dos testes de disco difusão para bacilos gram-negativos, não fermentadores de glicose e não fastidiosos no caso de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Além disso, acrescentou-se um comentário geral à Tabela 2B de que é possível realizar testes de isolados de *P. aeruginosa* de pacientes com fibrose cística, mas que pode ser necessário um período de incubação de até 24 horas. O subcomitê está trabalhando em recomendações para os testes de *S. maltophilia* e *B. cepacia* mediante CIM e disco difusão. No meio tempo, esses organismos (e outros nesse grupo) podem ser testados usando um método de CIM e os resultados, interpretados usando os pontos de corte fornecidos na Norma M7, Tabela 2B, para outros organismos não Enterobacteriaceae (ver o comentário geral 1, nessa tabela).**

17. Estamos realmente preocupados com a faixa de CIM da ofloxacina para *Salmonella typhi*. Conforme as diretrizes do NCCLS para Enterobacteriaceae, o resultado deveria ser $\leq 2\mu\text{g/mL}$ para que o microorganismo seja considerado sensível. Mas há evidência de que mesmo quando o resultado é 0,25 ou 0,5 $\mu\text{g/mL}$, esse agente antimicrobiano não é a droga de escolha, uma vez que os pacientes não respondem. Qual é a sua sugestão a esse respeito? Além disso, é apropriado checar a sensibilidade ao ácido nalidixico de isolados sanguíneos de *Salmonella typhi* como verificação cruzada da sensibilidade a ofloxacina? E se o isolado for resistente ao ácido nalidixico e sensível a ofloxacina?

- **O subcomitê espera tratar dessa questão no futuro. Por favor, reporte-se à resposta ao comentário 13.**
18. Tenho algumas perguntas sobre as informações apresentadas na Norma M100-S11. Na Tabela 2G da Norma M2-A7 (Zone Diameter Interpretive Standards and Equivalent MIC Breakpoints for *Streptococcus pneumoniae*), recomenda-se incubar a 35° C, em CO₂ a 5%, durante 20-24 horas. Na Tabela 2G da Norma M7-A5 (MIC Interpretive Standards for *S. pneumoniae*), recomenda-se incubar a 35° C, em ar ambiente, durante 20-24 horas. Eu uso tiras de E-test nas determinações da CIM para *S. pneumoniae* e, com frequência, coloco os discos de antibiótico na mesma placa. Essa prática é aceitável, uma vez que as atmosferas recomendadas para os testes de CIM e disco difusão são diferentes? Eu realmente não gosto da idéia de montar duas placas diferentes para cada CQ e isolado clínico quando preciso fazer tanto os testes de CIM como os de disco difusão. Nos anos que levo fazendo as determinações de CIM com o Etest para *S. pneumoniae*, sempre incubei o CQ e as cepas do paciente em CO₂ a 5%. Aliás, a empresa AB Biodisk (fabricante das tiras de Etest) recomenda a incubação de isolados de *S. pneumoniae* em CO₂ a 5%. Eu não tenho tido problemas de resultados de CQ fora das faixas aceitáveis. As recomendações do fabricante prevalecem sobre as recomendações do NCCLS? Poderia me fornecer informações sobre as diferenças nas recomendações relativas a incubação?
- **Nas tabelas do NCCLS, os critérios de interpretação para *S. pneumoniae* foram desenvolvidos usando incubação em CO₂ para os testes de disco difusão e ar ambiente para os de microdiluição em caldo. A correlação entre as CIMs e os diâmetros do halo basearam-se nesses testes. Não se fez a correlação da diluição em ágar com o disco difusão para *S. pneumoniae* quando esses critérios de interpretação foram estabelecidos. Testar com CO₂ pode mudar os resultados para certas drogas, ex., fluoroquinolonas, macrolídeos e tetraciclina. A questão de como isso pode afetar os testes realizados por métodos diferentes dos métodos de referência do NCCLS deve ser tratada pelos fabricantes desses métodos. A liberação dos sistemas comerciais pelo FDA indica que a agência concluiu que os dispositivos comerciais fornecem resultados de sensibilidade que são substancialmente equivalentes aos resultados gerados usando os métodos de referência do NCCLS para os organismos e agentes antimicrobianos descritos na literatura inserida no pacote dos agentes antimicrobiano aprovado pelo FDA.**
19. Observo que vocês recomendam apenas testes de CIM por diluição para *Helicobacter pylori*. Vocês pretendem elaborar diretrizes sobre testes de sensibilidade por disco difusão ou Etest?
- O Grupo de Trabalho PHLS para *Helicobacter* do Reino Unido deseja desenvolver orientação para testes de disco e estamos revisando a literatura. Gostaríamos de mencionar as recomendações do NCCLS. Se estiverem interessados nas nossas opiniões teremos o maior prazer em compartilhá-las com vocês.
- **O teste de diluição em ágar para *H. pylori* foi desenvolvido como um método de referência que pudesse ser usado em ensaios clínicos, de maneira que os resultados desses ensaios pudessem ser avaliados com maior precisão durante o processo de aprovação de novas drogas pelo FDA. Não planejamos desenvolver um teste de disco para *Helicobacter*, o que, de toda forma, poderia ser difícil devido à natureza fastidiosa do organismo. Uma vez que o Etest é um sistema comercial, não podemos recomendar testes usando esse método.**
20. São notáveis as mudanças recentes nas categorias de sensibilidade em função dos pontos de corte de ceftriaxona, cefotaxima e cefepima na Norma M100-S12, Tabela 2G M7-CIM. Entretanto, ainda restam várias perguntas importantes. Eu gostaria de algum *feedback* e comentários sobre as seguintes questões.
- (a) Por que os pontos de corte da penicilina G permaneceram inalterados?

- **Os pontos de corte da CIM da penicilina para *S. pneumoniae* foram estabelecidos muitos anos atrás, visando, principalmente, a orientar o tratamento da meningite pneumocócica, no qual CIMs acima de 0,1µg/mL prediziam fracasso clínico. Um resultado sensível à penicilina, seja com teste de CIM seja mediante o uso de teste de triagem por disco de oxacilina, indica que a cepa de pneumococo continua essencialmente sensível a todos os agentes beta-lactâmicos. Portanto, o valor preditivo de um resultado ‘sensível à penicilina’ usando os atuais pontos de corte tem utilidade considerável, especialmente em laboratórios onde não é possível realizar testes de CIM. Ao longo de várias reuniões, os membros do NCCLS expressaram sua preocupação de que um segundo conjunto de pontos de corte de CIM para penicilina poderia levar algumas pessoas a acreditar que um resultado sensível de ≤1µg/mL indicaria ainda ampla sensibilidade a todos os beta-lactâmicos, o que seria incorreto. Além disso, uma revisão detalhada dos dados de PK/PD e das simulações de Monte Carlo sugeriu que um ponto de corte de ≤1µg/mL, de sensível, não teria suporte, embora dados clínicos limitados sugerem que pacientes com pneumonia pneumocócica por tais cepas tiveram respostas favoráveis. A perda do valor preditivo de um resultado de sensível a penicilina, a confusão quanto à aplicação de um segundo conjunto de pontos de corte e os dados de PK/PD convenceram o subcomitê a manter o conjunto de pontos de corte e elaborar a nota de rodapé 5 como a melhor orientação possível para os médicos.**
- (b) Qual é a base lógica para permitir a amoxicilina e amoxicilina-clavulanate o luxo de ter pontos de corte que são uma diluição mais alta do que os dos agentes parenterais?
- **Favor reportar-se à resposta ao comentário 10.**
- (c) Como o comitê recomenda relatar *S. pneumoniae* resistente à penicilina? Deve-se recomendar cefotaxime e ceftriaxone para substituir a penicilina ao relatar resistência?
- **Não. Os resultados dos testes de cada produto devem ser relatados conforme delineado na Tabela 2G.**
- (d) Poderia o comitê explicar por que levofloxacina tem pontos de corte que são uma diluição mais alta do que gatifloxacina e moxifloxacina? Os atuais pontos de corte levam os clínicos a pensar que a potência das fluoroquinolonas mais novas são equivalentes. Eu apreciaria qualquer esclarecimento que pudessem me prestar.
- **Favor reportar-se à resposta ao comentário 14.**
21. Com as recentes mudanças nas normas de interpretação para *Streptococcus pneumoniae* (Tabela 2G), as cefalosporinas de terceira geração têm CIMs diferentes dependendo de a amostra ser originária de LCR ou de outros sítios corpóreos. No caso de *S. pneumoniae*, existem alguns problemas potenciais para os laboratórios, para os quais deveriam ser alertados. Tivemos um paciente de cinco anos de idade com esmagamento da face; dois dias mais tarde, apresentou estado mental alterado. Como a administração de agentes antimicrobianos foi iniciada antes de se realizar a punção lombar, as culturas sanguíneas produziram *S. pneumoniae*. Cinco horas mais tarde, quando a punção lombar foi realizada, era evidente que o paciente estava realmente com meningite, mas as culturas e as colorações gram eram negativas. Pelo Etest, a CIM para cefotaxime era 1.

Minha preocupação é que um laboratório, no futuro, relate tal resultado como “sensível” e que o clínico não esteja ciente dos valores específicos de CIM no Etest e de seu significado, e trate esse paciente com cefotaxima como droga única para sua meningite, baseado na sensibilidade de um isolado de sangue periférico. Nesse caso, e provavelmente em muitos outros, administram-se as drogas aos pacientes antes de se obter um espécime de LCR. Nesse caso, a cultura era negativa,

embora o paciente estava, claramente, com meningite. Se o organismo tivesse sido cultivado com base num espécime de LCR, teria sido considerado de resistência intermediária, e a terapia do paciente teria incluído cefotaxima e vancomicina.

Em todo o país, há hospitais que carecem de especialista em doenças infecciosas. Esses hospitais precisam de algum tipo de alerta, nos formulários dos relatórios, chamando a atenção dos clínicos sobre essa questão. Estamos implementado esse tipo de alerta no nosso hospital, e acreditamos que o sistema de comunicação através do NCCLS poderá ser a melhor maneira de disseminar estas informações.

- **Durante o período em que o subcomitê discutiu a propriedade de criar novos pontos de corte para pacientes que não têm meningite, reconhecemos que o pessoal dos laboratórios de microbiologia não sabem, com frequência, se o paciente tem, ou não, meningite, exceto quando se trata de esfregaço ou cultura positiva de LCR. Portanto, a nova Norma do NCCLS recomenda que os laboratórios relatem as interpretações de meningite apenas para os isolados de LCR, mas relatem ambas as interpretações para todos os outros espécimes, de maneira que os clínicos possam tomar a decisão correta para cada paciente. Os comentários 7 a 10 da Tabela 2G fornecem orientação adicional para uso com esses novos pontos de corte.**

Reconhecemos que implementar novos pontos de corte poderá trazer algumas dificuldades na comunicação acurada de resultados individuais de sensibilidade. Acompanharemos de perto essas preocupações durante o próximo ano. Pretendemos facilitar a atenção aos pacientes oferecendo critérios de interpretação clinicamente relevantes para os β -lactâmicos, de maneira a evitar a percepção de que são necessários agentes potencialmente mais tóxicos ou mais caros para infecções que não são do SNC, como a pneumonia.

Publicações Afins do NCCLS*

- GP2-A4** **Clinical Laboratory Technical Procedure Manuals; Approved Guideline—Fourth Edition (2002).** Este documento fornece diretrizes para o desenho, a preparação, a manutenção e o uso de manuais de procedimentos técnicos (seja em material impresso, seja em formato eletrônico) para uso nos laboratórios de patologia clínica.
- M2-A8** **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition (2003).** Este documento descreve as técnicas recomendadas atualmente para testes de sensibilidade por disco difusão e os critérios para os testes de controle de qualidade.
- M6-A** **Protocols for Evaluation Dehydrated Mueller-Hinton Agar; Approved Standard (1996).** Este documento inclui procedimentos para a avaliação de lotes de produção de ágar Mueller-Hinton, bem como o desenvolvimento e a aplicação de meios de referência.
- M11-A5** **Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard—Fifth Edition (2001).** Este documento fornece métodos de referência para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das bactérias anaeróbicas pelos métodos de macrodiluição em caldo, microdiluição em caldo e diluição em ágar, além de tabelas interpretativas e de controle de qualidade.
- M23-A2** **Development of *In Vitro* Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters; Approved Guideline—Second Edition (2001).** Este documento trata dos dados requeridos e recomendados necessários para a seleção de normas interpretativas e diretrizes de controle de qualidade apropriadas para os novos agentes antimicrobianos.
- M29-A2** **Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Second Edition (2001).** Com base nos regulamentos dos Estados Unidos, este documento fornece orientação relativa ao risco de transmissão dos vírus da hepatite e do vírus da imunodeficiência humana em qualquer ambiente laboratorial; precauções específicas para a prevenção da transmissão laboratorial de infecções transmitidas pelo sangue a partir de instrumentos e materiais de laboratório; assim como recomendações sobre a conduta em casos de exposição a microorganismos transmitidos pelo sangue.
- NRSCL8-A** **Terminology and Definitions for Use in NCCLS Documents; Approved Standard (1998).** Este documento fornece definições padrão para uso com as normas e diretrizes do NCCLS e para a apresentação, para aprovação, de métodos e materiais de referência ao National Reference System for the Clinical Laboratory.

* Documentos propostos e tentativos estão sendo apresentados através do processo consensual do NCCLS; portanto, os leitores deverão se reportar às edições mais recentes.

ANOTAÇÕES

ANOTAÇÕES

ANOTAÇÕES

ANOTAÇÕES

NCCLS ▼ 940 West Valley Road ▼ Suite 1400 ▼ Wayne, PA 19087 ▼ EUA ▼ FONE 610.688.0100
FAX 610.688.0700 ▼ E-MAIL: exoffice@nccls.org ▼ WEBSITE: www.nccls.org ▼ ISBN 1-56238-486-4

